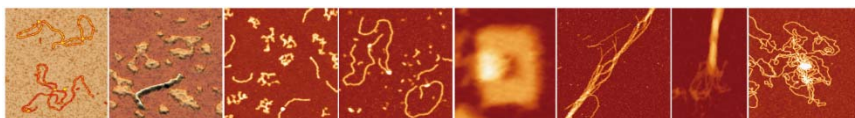


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Materia Condensada

**Caracterización de ácidos nucleicos, proteínas e interacciones proteína:proteína y DNA:proteína mediante microscopía de fuerzas atómicas**



**María Eugenia Fuentes Pérez**

**2009-2014**

TESIS DIRIGIDA POR

Dr. Fernando Moreno Herrero

Centro Nacional de Biotecnología

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Título tesis: Caracterización de ácidos nucleicos, proteínas e interacciones proteína:proteína y DNA:proteína mediante microscopía de fuerzas atómicas.

Título abreviado: Caracterización de Sistemas Biológicos con AFM.

Dirigida por: Dr. Fernando Moreno Herrero, científico titular del CSIC en el Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

Tutor: Prof. Dr. Julio Gómez, catedrático en el Departamento de la Materia Condensada de la Universidad Autónoma de Madrid.



**Centro Nacional de Biotecnología  
(CNB-CSIC)**



**Universidad Autónoma  
de Madrid (UAM)**

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible sin el proyecto *Starting Grant* del Consejo Europeo de Investigación (ref. 20611) y el proyecto nacional del Ministerio de Economía y Competitividad (ref. FIS2011- 24638). Además, las estancias en el laboratorio del Dr. Mark Dillingham en Bristol han sido financiadas con el proyecto I-LINK (ref. I-LINK0331).





*“What is a scientist after all? It is a curious man looking through a keyhole of nature, trying to know what’s going on.”*

*Jacques Yves Cousteau*



# Índice

Índice.....	i
Abstract.....	vii
Símbolos, abreviaturas y anglicismos .....	ix
Prólogo .....	xi
<b>1. Introducción a la Microscopía de Fuerzas Atómicas en Muestras Biológicas.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Potencial de interacción .....</b>	<b>1</b>
<b>3. Tipos de fuerzas.....</b>	<b>2</b>
3.1. Fuerzas de largo alcance .....	3
3.1.1. Fuerzas de van der Waals .....	3
3.1.2. Fuerzas electrostáticas de Coulomb.....	4
3.1.3. Fuerzas capilares o de adhesión .....	5
3.2. Fuerzas de corto alcance .....	6
3.2.1. Fuerzas de interacción química .....	6
3.2.2. Fuerzas de contacto mecánico.....	6
<b>4. Modos de operación en AFM .....</b>	<b>7</b>
4.1. Modo estático o de contacto .....	7

4.2. Modos dinámicos.....	8
4.2.1. Modulación en amplitud (AM-AFM) o <i>tapping</i> .....	9
4.2.2. Modulación en frecuencias (FM-AFM).....	10
4.3. Modo semi-dinámico o de salto: <i>Jumping mode</i> o <i>force volume</i> ..	11
<b>5. AFM de alta velocidad .....</b>	<b>12</b>
<b>6. Elección de la micropalanca .....</b>	<b>13</b>
<b>7. Resolución del AFM.....</b>	<b>14</b>
<b>8. Componentes de nuestro AFM .....</b>	<b>16</b>
<b>9. Preparación de los experimentos, adquisición y procesamiento de las imágenes .....</b>	<b>17</b>
9.1. Superficies y preparación de las muestras .....	17
9.2. Puesta a punto del AFM y aproximación.....	19
9.3. Adquisición de imágenes .....	20
9.4. Procesamiento de las imágenes .....	21
9.4.1. Artefactos de la imagen.....	21
<b>10. AFM aplicado a la biología.....</b>	<b>23</b>
 <b>2. Propiedades Mecánicas de Ácidos Nucleicos: DNA y RNA.....</b>	 <b>25</b>
<b>1. Introducción a los ácidos nucleicos .....</b>	<b>25</b>
1.1. Ácidos nucleicos con el AFM.....	27
1.1.1. Altura de las moléculas de DNA .....	27
1.1.2. Moléculas equilibradas y cinéticamente atrapadas .....	28
1.2. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos .....	29
1.2.1. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos con AFM.....	31
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>33</b>
2.1. Purificación de las moléculas de DNA y RNA.....	33
2.2. Preparación de las muestras para AFM.....	33
2.3. Condiciones de medida con el AFM.....	33
2.4. Obtención de trazas a partir de las imágenes de AFM .....	34
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>4. Resultados experimentales .....</b>	<b>37</b>
4.1. Adsorción de las moléculas de DNA y RNA a la mica .....	37
4.2. Co-adsorción de las moléculas de DNA y RNA .....	38
4.3. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos .....	39
4.4. Propiedades mecánicas a corta escala .....	40
<b>5. Discusión de los resultados .....</b>	<b>43</b>
 <b>3. Medidas de Volumen de Proteínas y Ácidos Nucleicos.....</b>	 <b>45</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>45</b>
1.1. Medidas de volumen .....	45
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>50</b>
2.1. Condiciones de medida con el AFM.....	50
2.2. Protocolo para obtener volúmenes.....	50
2.3. Proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas.....	51
2.3.1. Purificación de proteínas del complejo SMC.....	53

2.3.2. Preparación de las muestras para AFM.....	53
2.4. Medidas de volumen de moléculas de DNA de hebra sencilla.....	54
2.4.1. Fabricación de moléculas de ssDNA.....	55
2.4.2. Preparación de las moléculas de ssDNA para el AFM .....	55
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Resultados experimentales .....</b>	<b>58</b>
4.1. Descripción de una nueva aproximación para medir volúmenes que utiliza el DNA como molécula de referencia.....	58
4.2. Estudio de las proteínas del complejo SMC .....	60
4.2.1. Caracterización de las proteínas SMC utilizando la técnica del análisis de volumen.....	60
4.2.2. Caracterización de las proteínas ScpA y ScpB utilizando la técnica del análisis de volumen.....	63
4.3. Los volúmenes medidos a partir de imágenes de AFM son proporcionales al peso molecular de proteínas.....	64
4.4. Interacciones entre los componentes del complejo SMC .....	66
4.4.1. Estudio de la interacción entre SMC y ScpA .....	67
4.4.2. Estudio de la interacción entre SMC y ScpB .....	67
4.4.3. Estudio de la interacción entre ScpA y ScpB .....	68
4.4.4. Estudio de la interacción entre los tres componentes del complejo SMC .....	69
4.5. Estabilidad estequiométrica .....	71
4.6. Consideraciones técnicas sobre el cálculo de volúmenes .....	72
4.6.1. Elección del volumen de referencia de DNA.....	72
4.6.2. Tamaño de la punta .....	74
4.7. Aplicación del método de volúmenes a DNA de cadena sencilla	76
<b>5. Discusión de los resultados .....</b>	<b>78</b>
 <b>4. Proteínas Iniciadoras de la Replicación Caracterizadas por AFM .....</b>	 <b>81</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>81</b>
1.1. Iniciación de la replicación en el plásmido RK2 .....	84
1.1.1. Experimentos de SPR.....	85
1.2. Iniciación de la replicación en el plásmido F.....	86
1.3. Proteínas <i>Rep</i> como modelo de estructuras amiloides.....	87
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>89</b>
2.1. Purificación de las proteínas <i>Rep</i> : TrfA ,RepE y RepA.....	89
2.2. Preparación de las muestras para AFM.....	89
2.3. Condiciones de medida con el AFM .....	90
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>91</b>
<b>4. Resultados experimentales .....</b>	<b>92</b>
4.1. Proteína TrfA.....	92
4.1.1. Unión de TrfA a los iterones .....	92
4.1.2. Unión de TrfA a los iterones y a la región rica en AT simultáneamente: caracterización de alturas.....	93

4.1.3. Estudio de la formación del complejo triple DNA:TrfA:oligo mediante el análisis de volúmenes .....	95
4.1.4. Necesidad de los cuatro 13-meros para que se produzca el complejo ternario .....	96
4.1.5. Mutaciones puntuales en la secuencia del oligo inf. modifican la formación del complejo ternario .....	98
4.2. Proteína RepE .....	100
4.2.1. Unión de RepE a los iterones.....	100
4.2.2. Unión de RepE a los iterones y a la región rica en AT simultáneamente: caracterización de alturas.....	102
4.3. Proteína RepA .....	103
<b>5. Discusión de los resultados .....</b>	<b>106</b>

## 5. Otras aplicaciones de la microscopía de fuerzas a estructuras autoensambladas .....109

<b>1. Aplicación de los ácidos nucleicos a la nanotecnología: estructuras de DNA origami .....</b>	<b>111</b>
1.1. Introducción al DNA origami.....	111
1.1.1. Nanoporos de DNA origami .....	112
1.1.2. Nanocontenedores de DNA origami.....	113
1.2. Materiales y métodos.....	114
1.2.1. Nanoporos de DNA origami .....	114
1.2.2. Nanocontenedores de DNA origami.....	116
1.2.3. Condiciones de medida con el AFM .....	117
1.3. Objetivos.....	117
1.4. Resultados experimentales.....	117
1.4.1. Nanoporos de DNA origami .....	117
1.4.2. Nanocontenedores de DNA origami.....	121
1.5. Discusión de los resultados.....	123
<b>2. Interacción del péptido KF con el DNA .....</b>	<b>125</b>
2.1. Introducción .....	125
2.2. Materiales y métodos.....	126
2.3. Objetivos.....	127
2.4. Resultados experimentales.....	127
2.4.1. KF sin DNA.....	127
2.4.2. Interacción de KF con DNA de cadena doble.....	128
2.4.3. Interacción de KF con DNA de cadena sencilla .....	129
2.5. Discusión de los resultados.....	130
<b>3. Filamentos de TubZ .....</b>	<b>133</b>
3.1. Introducción .....	133
3.2. Materiales y métodos.....	134
3.3. Objetivos.....	135
3.4. Resultados experimentales.....	135
3.4.1. Filamentos de TubZ.....	136
3.4.2. Filamentos de TubZ y TubY .....	138
3.5. Discusión de los resultados.....	139

6. Conclusiones.....	141
Publicaciones .....	145
Bibliografía.....	147
Agradecimientos.....	167





## Abstract

Many biological processes depend on the ability of molecules to adopt a certain conformational shape or to be located in a certain position in the cell. The Atomic Force Microscopy (AFM) is a powerful technique that allows visualizing biological samples once adsorbed on an atomically-flat surface. In this dissertation we present different applications of AFM imaging to nucleic acids, proteins and protein:protein or protein:DNA interactions.

**Chapter 1** provides a general introduction to the basis of the AFM technique, focusing on tip-sample interactions, measurement modes, sample preparation and images acquisition. **Chapter 2** presents the study of mechanical properties of RNA molecules. The behavior of RNA and DNA molecules found at short distances differs from that predicted by the WLC model. While DNA molecules behave as more flexible structures at short distances as previously published, RNA molecules become as a more rigid polymeric chain. **Chapter 3** exploits a new approach to measure volumes from AFM images. This approach is applied to determine the stoichiometry of proteins of the *Bacillus subtilis* SMC complex and the interactions between the SMC protein components. Also, we found a linear relationship between volumes of ssDNA molecules and their nucleotides length. **Chapter 4** focus on the characterization of DNA:protein interactions applied to *Rep* proteins, involved in the replication initiation of bacterial plasmids. Our findings support a general mechanism for *Rep* proteins in which first, *Rep* proteins bind at the iteron position and second, specifically interact with one strand of the replication bubble. Also, we characterized the formation of amyloid fibers of RepA protein. Other contributions during these years of PhD are briefly described in **Chapter 5**: DNA origami characterization, structural description of helical filament formations (TubZ proteins) and interactions between the peptide KF and DNA. Finally, **Chapter 6** collects the main conclusions of this dissertation.



## Símbolos, abreviaturas y anglicismos

A	Adenina.
AAA+	Dominio de unión de ATP.
ADN o DNA	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosina-5'-trifosfato.
AFM	Microscopía (o microscopio) de fuerzas atómicas.
ARN o RNA	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosina-5'-trifosfato.
bp	Pares de bases.
C	Citosina.
CL	Longitud de contorno.
DBD	Dominio de unión al DNA (por sus siglas en inglés, <i>DNA binding domain</i> ).
DnaA	Puede hacer referencia a la secuencia del DNA (cajas de DnaA) o a la proteína iniciadora de la replicación específica de la bacteria huésped (proteína DnaA).
<i>Drift</i>	Deriva.
<i>f</i>	Frecuencia de barrido.
<i>Feedback</i>	Sistema de realimentación.
<i>f<sub>r</sub></i>	Frecuencia de resonancia de la micropalanca.
G	Guanina.
GDP	Guanosina-5'-difosfato.
GTP	Guanosina-5'-trifosfato.
Inf. / oligo inf.	Oligo que contiene la secuencia de la hebra inferior de la región rica en ATs del origen correspondiente.
<i>k</i>	Constante de fuerza de la micropalanca.

$k_B$	Constante de Boltzmann.
KF	Kahalalide F.
L, M1, M2 y R	Secuencias repetidas ricas en ATs del OriV (por sus siglas en inglés, <i>Left</i> , <i>Middle 1</i> , <i>Middle 2</i> y <i>Right</i> ).
ME	Microscopía Electrónica.
MT	Pinzas magnéticas (por sus siglas en inglés, <i>Magnetic Tweezers</i> ).
nt	Nucleótidos.
OBP	Proteínas de unión al origen de replicación (de sus siglas en inglés, <i>Origin Binding Proteins</i> ).
OriS	Origen del plásmido F.
OriV	Origen del plásmido RK2.
OT	Pinzas ópticas (por sus siglas en inglés <i>Optical Tweezers</i> ).
$P$	Longitud de persistencia.
PCR	Reacción en cadena por la polimerasa (por sus siglas en inglés de <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
<i>Rep</i>	Proteínas iniciadoras de la replicación específicas del plásmido.
SPR	(de sus siglas en inglés, <i>Surface Plasmon Resonance</i> ).
SSB	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla (de sus siglas en inglés, <i>Single Stranded Binding protein</i> ).
ssDNA	DNA de cadena sencilla.
STM	Microscopía (o microscopio) de efecto túnel.
Sup. / oligo sup.	Oligo con la hebra superior de la región rica en ATs del <i>origen</i> correspondiente.
T	Timina.
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris-borate y 2 mM EDTA, pH 8.3).
U	Uracilo.
WH	Dominio <i>Winged Helix</i> .

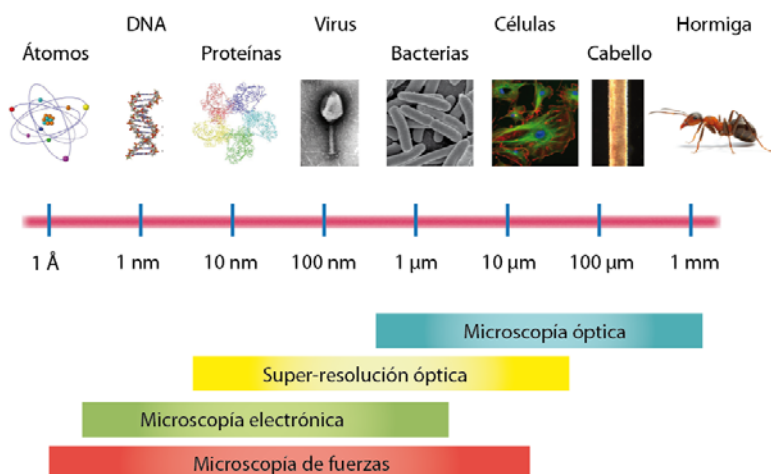
## Prólogo

Entender de qué están hechas las cosas y cómo funcionan ha sido a lo largo de la historia una meta para muchos científicos. Unos se interesan por la materia más lejana en el Universo, otros se centran en comprender qué función tienen los átomos que nos forman. Esto se explica porque la Naturaleza proporciona una gran variedad de sistemas complejos que funcionan en escalas muy distintas y que pueden tomarse como modelo para posteriormente desarrollar nuevas tecnologías.

La física que rige los sistemas macroscópicos cambia cuando la escala se reduce hasta el rango del nanómetro. Un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro,  $10^{-9}$  m. Para ilustrar lo que es un nanómetro, nótese que la proporción de diámetros que hay entre la Tierra y un balón de fútbol, es similar a la que hay entre un balón de fútbol y un objeto nanométrico. En esta escala aparecen nuevos fenómenos y nuevas propiedades que no pueden ser vistos en la escala macroscópica, como son los efectos cuánticos, etc. Estudiar objetos en la escala nanométrica sigue siendo un reto hoy en día y ha llevado a desarrollar nuevas disciplinas como son la nanociencia y la nanotecnología.

La **nanociencia y la nanotecnología** engloban gran parte de la ciencia y tecnología que nos rodea hoy en día: la fabricación de chips cada vez más pequeños, nanopartículas que actúan como pequeños contenedores de medicamentos, biosensores para la detección precoz del cáncer, nanorobots, tejidos compuestos por nanopartículas, nanomateriales que aumentan la eficiencia de los paneles solares, etc. y seguirán proporcionando nuevas alternativas en el futuro debido a la gran variedad de disciplinas a las que engloban: como la química, física, matemáticas, biología, ingeniería, ciencia de los materiales, medicina, informática, etc.

Dentro de la gran familia de la nanociencia se encuentra la **biofísica**. La biofísica es un campo multidisciplinar en el que se utilizan herramientas físicas para poder entender sistemas biológicos. La mayor parte de los procesos biológicos ocurren en la escala nanométrica y hasta hace poco más de medio siglo eran procesos desconocidos (en la **Figura i** se muestra el orden de magnitud en sistemas biológicos).



**Figura i. Orden de escala espacial en sistemas biológicos: desde una hormiga hasta un átomo.** En la parte inferior se muestra el orden de magnitud en el que pueden operar distintas microscopías. Imágenes tomadas de internet y de (Cuervo, 2012) y (Daudén, 2013).

En el famoso discurso del físico Richard Feynman “*There is plenty of room at the bottom*” en 1959, ya mencionaba la posibilidad de tomar la Naturaleza como modelo para fabricar objetos que funcionen de manera parecida:

*“...Biology is not simply writing information; it is doing something about it. A biological system can be exceedingly small. Many of the cells are very tiny, but they are very active; they manufacture various substances; they walk around; they wiggle; and they do all kinds of marvelous things -all on a very small scale. Also, they store information. Consider the possibility that we too can make a thing very small which does what we want- that we can manufacture an object that manoeuvres at that level!...”*

Esta idea de Feynman no fue posible llevarla a cabo hasta el descubrimiento del microscopio de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés *Scanning Tunneling Microscope*) en 1981 por dos científicos de la compañía IBM llamados G. Binnig y H. Rohrer, que posteriormente recibieron el premio Nobel en 1986. El STM fue la primera técnica que permitía manipular átomos y obtener verdadera resolución atómica (Binnig, 1982). El desarrollo del STM condujo al posterior descubrimiento del microscopio de fuerzas atómicas (AFM, por sus siglas en inglés *Atomic Force Microscope*) por G. Binnig, C. F. Quate y C. Gerber en el año 1986 (Binnig, 1986).

El STM y el AFM pertenecen al grupo de los microscopios de barrido, también llamados **microscopios de proximidad**. Al contrario de otros tipos de microscopios, como son el óptico y el electrónico que utilizan un haz de partículas (fotones o electrones respectivamente) para obtener una imagen, los microscopios de proximidad utilizan una sonda para obtener información de las interacciones entre la punta y la superficie. La sonda es normalmente una punta afilada que recorre una superficie. La punta está situada en el extremo libre de una palanca de dimensiones micrométricas, cuya deflexión se mide mediante la reflexión de un haz láser sobre el extremo de la palanca, que a su vez se recoge en un fotodiodo. El resultado final es una imagen ampliada a partir de la cual se obtiene la topografía de la superficie.

El interés por querer ver objetos cada vez más pequeños ha llevado al perfeccionamiento de las técnicas de microscopía. La microscopía electrónica (EM) desarrollada en los años 30, ha permitido resolver los mapas de densidad electrónica de complejos proteicos con resolución atómica. Hoy en día se siguen buscando los límites de la técnica al incorporar cámaras de detección CMOS y mejorar los algoritmos de procesamiento de las imágenes (McMullan, 2009). Por otra parte, los microscopios de fluorescencia han permitido localizar moléculas en la célula alcanzando una resolución por debajo del límite de la difracción de la luz, lo que se conoce como super-resolución (Huang, 2009). En la **Tabla i** se muestran las características generales de las técnicas de microscopía más comunes para el estudio de muestras biológicas.

Como una segunda clasificación, también se puede considerar a los microscopios de proximidad como técnicas de molécula individual. Las **técnicas de molécula individual** permiten estudiar moléculas individualmente, es decir, cada señal obtenida viene de una única molécula al contrario de las técnicas multipartícula o *bulk* donde las propiedades se obtienen de un promedio de muchos eventos. Un ejemplo ilustrativo sería una maratón popular. Mientras el tiempo medio para completar la carrera es de 5 horas aprox., si miramos independientemente a cada uno de los corredores de la maratón, veremos que el ganador tarda poco más de 2 horas y que otros no consiguen llegar a meta.

En los experimentos multipartícula, la medida que se obtiene es un valor medio de la población total de moléculas. En la mayoría de los casos, se requiere que la reacción esté sincronizada, lo que no es siempre posible debido a la heterogeneidad de los procesos o la existencia de estados intermedios. Esto esconde comportamientos atípicos dentro de una reacción, lo que correspondería en el ejemplo de la maratón con el corredor más lento, el más rápido o el que se para a beber agua. Las heterogeneidades causadas por muchas moléculas o individuos haciendo algo al mismo tiempo se conoce como desorden dinámico (Zwanzig, 1992) (Min, 2005).

Tabla i. Técnicas de microscopía (Allison, 2010).

Técnicas microscopía	Límite resolución	Características generales
Microscopía óptica	0.2 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"><li>- Puede utilizarse tanto en aire como en líquido en condiciones fisiológicas.</li><li>- Limitado por la longitud de onda del visible (200 nm aprox.).</li><li>- Estos microscopios sufren de aberraciones cromáticas y esféricas, de astigmatismo y distorsión.</li></ul>
Microscopía de fluorescencia	150 nm para la luz verde o > 1 $\mu\text{m}$ para la luz blanca.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Puede utilizarse en aire y en líquido con condiciones fisiológicas.</li><li>- Es necesario etiquetar con un fluoróforo el componente que se quiera estudiar.</li><li>- Hasta hace poco estaba limitada por la longitud de onda de la luz, pero con las nuevas técnicas de ultra-resolución (STED, PALM, etc.) es posible obtener resolución nanométrica.</li><li>- Sufren los mismos artefactos que los ópticos.</li></ul>
Microscopía electrónica (SEM y TEM)	Desde pocos angstroms (TEM) hasta ~ 100 nm (SEM).	<ul style="list-style-type: none"><li>- Permite estudiar grandes complejos proteicos e interacciones entre proteínas. Las moléculas pequeñas (&lt; 100 kDa) pueden dar problemas.</li><li>- Estos microscopios operan en vacío y de manera general es necesario tratar la superficie para mejorar el contraste de la imagen.</li><li>- Sufren de aberraciones esféricas y de astigmatismo.</li></ul>
Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	Escala nanométrica	<ul style="list-style-type: none"><li>- Se puede trabajar en vacío, aire y líquido en condiciones fisiológicas.</li><li>- Las muestras biológicas deben ser inmovilizadas en una superficie atómicamente plana.</li><li>- Se obtiene una imagen topográfica en 3D de la superficie.</li><li>- Las imágenes topográficas normalmente sufren del efecto de la dilación entre la punta y la muestra.</li></ul>

Por el contrario, los experimentos de molécula individual no requieren de la sincronización de la reacción debido a que cada molécula se observa de forma independientemente. Sin embargo, la misma molécula no siempre se comporta de la misma manera. Volviendo a la analogía de la maratón, un atleta maratoniano no siempre hace los mismos tiempos o se para a beber agua en los mismos lugares. La heterogeneidad observada en una misma molécula o individuo se conoce como desorden estático (Kuo, 2010) (Heller, 2014).

Cada una de las técnicas de molécula individual está basada en distintas estrategias para atrapar, manipular y visualizar directa o indirectamente moléculas individuales. Por ejemplo, las pinzas ópticas (OT) y las pinzas magnéticas (MT) emplean un haz láser o un campo magnético para atrapar partículas



dieléctricas o magnéticas, respectivamente. Las técnicas de fluorescencia (TIRF, FRET, etc.) utilizan moléculas fluorescentes y algoritmos de reconstrucción para obtener la posición de las partículas con gran precisión. La mayoría de las técnicas extraen información de manera indirecta, por ejemplo, siguiendo la posición de una partícula dieléctrica/magnética que de manera general es mucho más grande ( $\sim$  micras) que el objeto que se quiere estudiar ( $\sim$  nanómetros). El AFM permite observar proteínas directamente con una sonda, con la única restricción de estar adsorbidas sobre una superficie.

El AFM es una técnica muy versátil que puede trabajar en cualquier ambiente (vacío, aire y líquido) y que permite estudiar una gran variedad de materiales y muestras biológicas. Muchos grupos de investigación siguen hoy en día probando los límites de esta microscopía y combinándola con otras técnicas, como fluorescencia, para así obtener una visión más global del mundo nanométrico. En particular, su aplicación a sistemas biológicos ha permitido visualizar entre otros, proteínas, ácidos nucleicos, virus y células (Pyne, 2014).

En esta tesis se presentan distintas aplicaciones del AFM a sistemas biológicos, tales como ácidos nucleicos, proteínas o interacciones entre ambos. En el **Capítulo 1** se introducen los conceptos básicos del microscopio de fuerzas atómicas: se describen las interacciones que tienen lugar entre la punta y la muestra, los distintos modos de medida, la preparación de las muestras y la adquisición de las imágenes. A partir del segundo capítulo se describen los resultados experimentales obtenidos en esta tesis. En el **Capítulo 2** se estudian y comparan las propiedades mecánicas del DNA y del RNA de doble hebra. En el **Capítulo 3** se desarrolla una nueva aproximación para medir volúmenes a partir de imágenes de AFM y se aplica a proteínas y a moléculas de DNA de cadena sencilla. En el **Capítulo 4** se caracteriza la interacción DNA:proteína de las proteínas iniciadoras de la replicación en plásmidos, y se estudia la formación de fibras amiloides de la proteína RepA. En el **Capítulo 5** se incluyen de manera más breve otras colaboraciones realizadas durante la tesis, como la caracterización de estructuras de DNA origami, proteínas que forman fibras (TubZ) y la interacción entre el péptido KF y el DNA. Por último, en el **Capítulo 6** se enumeran las principales conclusiones de la tesis.



# 1. Introducción a la Microscopía de Fuerzas Atómicas en Muestras Biológicas

## 1. Introducción

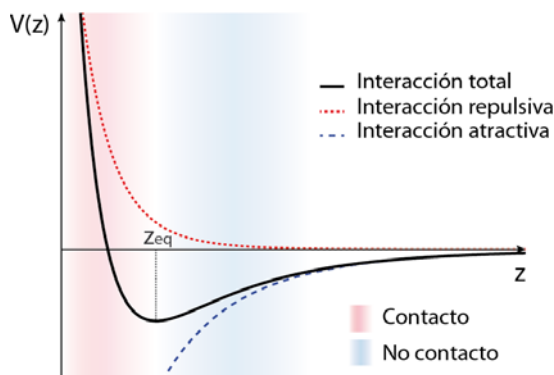
La microscopía de fuerzas atómicas es una técnica excelente para estudiar muestras biológicas, con el único requisito de que la muestra debe de estar adsorbida en una superficie. En este capítulo vamos a explicar con detalle las interacciones que tienen lugar entre la punta y la muestra cuando ambas están muy próximas entre sí y los distintos modos de medida del AFM para obtener la topografía de las muestras biológicas. También trataremos con detalle los distintos tipos de superficie que se emplean para adsorber muestras biológicas, la preparación de las mismas, el procedimiento de adquisición de las imágenes y su posterior procesamiento.

## 2. Potencial de interacción

Dado que el principio básico del AFM se basa en una punta que recorre la superficie de una muestra, las interacciones entre punta-muestra vienen descritas según la mecánica del estado sólido por potenciales de interacción. Uno de los modelos matemáticos más usados para representar las fuerzas químicas entre átomos es el potencial de Lennard-Jones, que viene descrito por la ecuación:

$$V(z) = -4\varepsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{z} \right)^6 - \left( \frac{\sigma}{z} \right)^{12} \right] \quad (1.1)$$

donde  $\varepsilon$  y  $\sigma$  son parámetros empíricos, que hacen referencia a la profundidad del potencial y a la posición del potencial, respectivamente y  $z$  es la distancia intermolecular o en el caso del AFM, la distancia punta-muestra. El primer término de la ecuación es atractivo y proviene de las interacciones de van der Waals que describiremos más adelante (Sección 3.1.1), mientras que el segundo término viene de las fuerzas repulsivas entre dos átomos. La curva que describe este potencial de interacción se puede ver en la **Figura 1.1**.



**Figura 1.1. Potencial de interacción de Lennard-Jones.** Con fondo rojo está representada la zona de contacto donde predomina la interacción repulsiva y con fondo azul la zona de no contacto donde predomina la interacción atractiva. La  $z_{eq}$  es la distancia de equilibrio en la cual dos objetos (punta-muestra) entran en contacto sin ejercerse fuerza entre ellos.

En líquido, la fuerza neta de van der Waals puede ser atractiva o repulsiva (García, 1992), por lo que el potencial de interacción es algo distinto. La posición de equilibrio que delimita la zona de contacto y no contacto ya no está tan definido y la curva es más plana en la región atractiva.

A continuación veremos más detalladamente las fuerzas que tienen lugar en el sistema punta-muestra, así como las diferentes situaciones que se presentan en aire y en líquido.

### 3. Tipos de fuerzas

Cuando trabajamos en la escala nanométrica las fuerzas que tienen lugar se pueden dividir en dos grupos dependiendo del rango de interacción: fuerzas de largo alcance y fuerzas de corto alcance. A continuación vamos a describir con más detalle cada una estas fuerzas.

### 3.1. Fuerzas de largo alcance

Las fuerzas que se observan a partir de los 10 nm de separación entre la punta y la muestra se denominan fuerzas de largo alcance. Los diferentes tipos se describen a continuación.

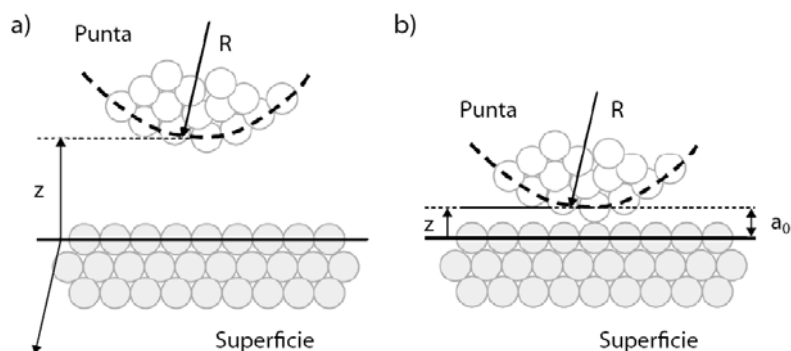
#### 3.1.1. Fuerzas de van der Waals

Las fuerzas de van der Waals provienen tanto de las fluctuaciones en los momentos de los dipolos eléctricos de los átomos como de su polarización. Son fuerzas atractivas y están siempre presentes independientemente de la composición química de la superficie o del medio (García, 2002).

El potencial de interacción entre dos átomos en función de la distancia viene dado por la expresión  $V(r) = -C/r^6$ , donde  $C$  es el coeficiente específico de interacción para los dos átomos que están interaccionando. Sin embargo, las fueras de van der Waals presentes entre la punta y la muestra, surgen como un efecto acumulativo de los átomos más cercanos que forman el sistema punta-muestra. Aproximando este sistema a una esfera y una superficie plana, y asumiendo aditividad de las fuerzas se puede deducir que la fuerza de van der Waals viene dada por (García, 2002):

$$F_{\text{vdW}}(z) = -\frac{HR}{6z^2} \quad \text{para } z > a_0 \quad (1.2)$$

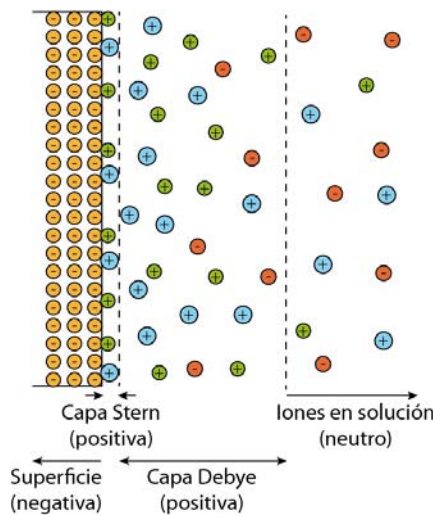
donde  $H$  es la constante de Hamaker,  $R$  es el radio de la punta,  $z$  es la distancia entre la punta y la muestra y  $a_0$  es la distancia intermolecular (ver **Figura 1.2**). Las fuerzas de van der Waals tienen un alcance entre los 10 y 15 nm. A partir de la ecuación anterior, se deduce que dichas fuerzas se pueden reducir utilizando puntas más afiladas ( $R$  pequeño). En líquido las fuerzas de van der Waals son menores que al aire, dado que la constante de Hamaker puede ser de al menos un orden de magnitud menor (Goodman, 1991).



**Figura 1.2. Esquema de un sistema punta-muestra a punto de entrar en contacto. a) Punta-muestra separadas una distancia  $z$ . b) Punta-muestra en contacto separadas por  $a_0$ , distancia intermolecular. Esquema adaptado de (Lee, 2003).**

### 3.1.2. Fuerzas electrostáticas de Coulomb

Las fuerzas electrostáticas provienen de la presencia de cargas electrostáticas tanto en la punta como en la superficie de la muestra. Las cargas electrostáticas superficiales se contrarrestan por una nube de iones de signo opuesto llamados contraiones. Parte de los contraiones se adhieren a la superficie formando la capa de Stern (0.1 – 0.5 nm espesor) mientras que otros se quedan cerca de la superficie apantallando las cargas superficiales y formando la doble capa de Debye (5 – 20 nm espesor), también conocida como capa difusa (ver **Figura 1.3**). Las fuerzas electrostáticas son muy importantes cuando se trabaja en medio líquido, puesto que las fuerzas de van der Waals y las capilares son casi despreciables.



**Figura 1.3. Representación gráfica de la capa de Stern y la capa de Debye en una superficie negativa en contacto con una solución acuosa.** En el ejemplo mostrado hay un tipo de iones negativos y dos tipos de iones positivos.

La fuerza electrostática para el sistema punta-muestra aproximado por una esfera y un plano, decae exponencialmente con la distancia y viene dada por (Baró, 2012):

$$F(z) = \frac{4\pi\sigma_t\sigma_s R\lambda_D}{\varepsilon} e^{-z/\lambda_D} \quad \text{con } z > \lambda_D \quad (1.3)$$

donde  $\lambda_D$  es la longitud de Debye,  $\sigma_t$  y  $\sigma_s$  las densidades superficiales de carga de la punta y de la muestra respectivamente,  $R$  es el radio de la punta y  $\varepsilon$  la constante dieléctrica (Sotres, 2007). La longitud de Debye define el espesor típico de la capa difusa y viene dada por:

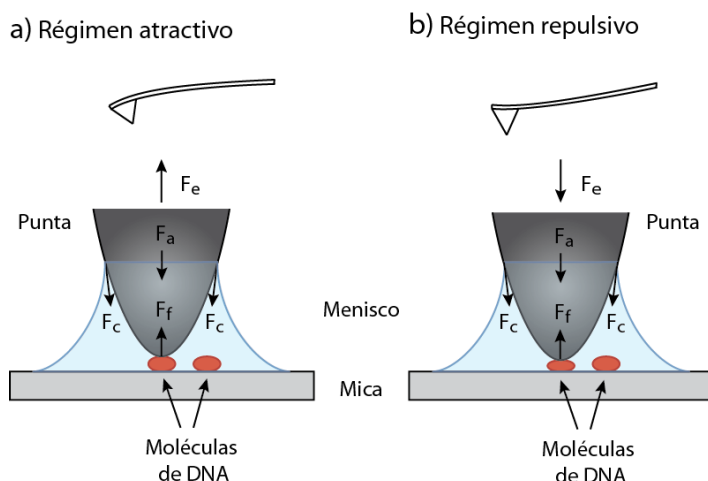
$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2}} \approx \frac{0.3}{\sqrt{\sum_i c_i z_i^2}} \quad (1.4)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann ( $1.38 \text{ E-}23 \text{ J/K}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta (en K),  $e$  es la carga del electrón,  $c_i$  es la concentración molar (en mol/l) y  $z_i$  es la valencia iónica (incluyendo el signo) del componente  $i$ .

### 3.1.3. Fuerzas capilares o de adhesión

Por el hecho de estar en condiciones ambientales con una cierta humedad, la superficie y la punta están cubiertas por una delgada capa de agua. Estas moléculas de agua adsorbidas en la superficie forman un menisco entre la punta y la superficie cuando ambas están próximas. El menisco implica una fuerza capilar atractiva que depende de la distancia (García, 2002). Cuando la punta se separa de la superficie tiene que vencer la fuerza capilar, produciendo una fuerza de adhesión entre la punta y la superficie. A medida que aumenta la humedad relativa, mayor es la cantidad de moléculas de agua adsorbidas en la superficie, y por lo tanto, mayor es la fuerza de adhesión. Para un sistema modelo de una punta de silicio y una superficie de silicio, la fuerza de adhesión alcanza su máximo entre humedades relativas del 60-80% (Jones, 2002).

La fuerza capilar se reduce cuando se trabaja en el régimen atractivo debido a que la flexión del cantiléver genera fuerzas elásticas que contrarrestan la fuerza capilar (ver **Figura 1.4**) (Yang, 1996).



**Figura 1.4. Detalle de la fuerza elástica ( $F_e$ ) en el régimen a) atractivo o b) repulsivo.** La fuerza capilar ( $F_c$ ), atractiva, está representada en el caso de que la punta se aproxime a la superficie en la dirección  $z$ . En el caso del régimen repulsivo, las moléculas de DNA se ven aplastadas por la punta. La  $F_a$  hace referencia a la fuerza de adhesión y la  $F_f$  a la fuerza de fricción que se ejerce entre la punta y la superficie. Esquema adaptado de (Yang, 1996).

Las fuerzas capilares están presentes solamente cuando se trabaja en aire. En líquido estas fuerzas no existen dado que todo el sistema punta-muestra está inmerso en líquido y no se forma un menisco entre la punta y la mues-

tra. Sin embargo, en medio líquido es posible tener adhesión de la punta sobre la superficie, dependiendo del tampón con el que trabajemos. Debido a que la naturaleza de las fuerzas de adhesión es también electrostática, la fuerza se puede reducir optimizando el equilibrio entre iones monovalentes, divalentes, etc. en la solución acuosa, puesto que la longitud de Debye depende fuertemente de la valencia de los iones (**Ec. 1.4**). Esta fuerza de adhesión hay que vencerla para poder observar los objetos nanométricos adsorbidos en la superficie.

### 3.2. Fuerzas de corto alcance

Las fuerzas de corto alcance permiten obtener imágenes atómicas de alta resolución. Los distintos tipos de fuerzas de corto alcance se describen a continuación.

#### 3.2.1. Fuerzas de interacción química

Cuando los átomos están muy próximos entre sí surgen las fuerzas de interacción química, que son las que hacen que los átomos estén unidos formando moléculas. Estas fuerzas se manifiestan cuando las nubes electrónicas de los átomos de la punta y la muestra se superponen. Tienen lugar a distancias subnanométricas (0.1 - 0.2 nm).

#### 3.2.2. Fuerzas de contacto mecánico

Cuando dos cuerpos elásticos entran en contacto, se producen fuerzas intermoleculares de corto alcance en la región próxima al contacto (Feng, 2000). Las fuerzas debidas al contacto hacen referencia a la fuerza normal y lateral a la superficie que se producen debido al contacto mecánico entre la punta y la superficie. Este contacto produce una deformación de las partículas respecto a su forma original.

Existen diferentes aproximaciones para relacionar la fuerza con la deformación de la muestra (Carpick, 1999). Uno de los modelos que describen el contacto mecánico entre dos objetos es el de Hertz (Johnson, 1987). Este modelo se basa únicamente en considerar las fuerzas repulsivas y no tiene en cuenta las fuerzas de adhesión. También se desarrollaron otros modelos como el de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) (Johnson, 1971) o el de Derjaguin-Müller-Toporov (DMT) (Derjaguin, 1975). El primero considera que las fuerzas de adhesión están dentro del área de contacto, mientras que el segundo las considera únicamente fuera del área de contacto. También existe el modelo de Tatara (Tatara, 1993) que considera deformaciones del objeto entero en el eje z. De manera general, se puede decir que no existe un modelo único para describir las deformaciones mecánicas, sino que cada modelo es únicamente válido en casos particulares (Johnson, 1997).



## 4. Modos de operación en AFM

En esta sección describiremos los principales modos de medida para obtener imágenes topográficas con el AFM: el modo de contacto, el modo dinámico y el modo de salto. También existen otros modos de medida que permiten obtener otro tipo de información, a veces complementaria a la topográfica, que por motivos de brevedad no describiremos en esta tesis. Algunos ejemplos son: la caracterización de cargas eléctricas superficiales (*kelvin probe*) o campos magnéticos (MFM) de una superficie, el estudio de las propiedades mecánicas de materiales y de proteínas mediante indentaciones o estiramientos (*pushing* o *pulling*), etc.

### 4.1. Modo estático o de contacto

El modo estático o de contacto fue el primer modo de medida utilizado por Binnig et al. para observar alúmina con el AFM (Binnig, 1986). Es uno de los métodos de medida más sencillos en el cuál se sitúa la punta en contacto directo con la superficie y realiza el barrido. Al entrar en contacto la punta con la superficie la micropalanca se flexiona ejerciendo una fuerza normal sobre la superficie. Para desplazamientos pequeños, la relación entre la fuerza normal y el desplazamiento puede aproximarse por la ley de Hooke:

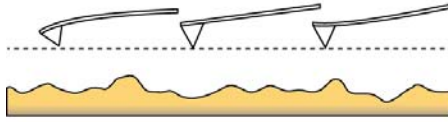
$$F = -kx \quad (1.5)$$

donde  $k$  es la constante elástica y  $x$  es la flexión de la micropalanca. En el modo de contacto predominan las fuerzas repulsivas entre la punta y la muestra. Existen dos modos de medida que se basan en mantener la altura constante entre punta-muestra o bien en mantener la deflexión del cantiléver (es decir, la fuerza) constante mientras el tubo piezoeléctrico realiza el barrido de la superficie en el plano XY (ver **Figura 1.5**).

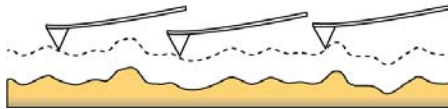
Debido a que existe un contacto directo entre la punta y la muestra, las fuerzas laterales que se producen durante el barrido en el eje X son elevadas ( $\sim$  nN) (Le Grimmelc, 1998). Las fuerzas laterales están relacionadas con las fuerzas de torsión de la micropalanca ( $F_{xy}$ ) (Neumeister, 1994). De manera general, la constante de torsión de una micropalanca ( $k_{xy}$ ) es entre 40 y 200 veces mayor que la constante normal ( $k$ ) (Carpick, 1997) (Raman, 2008). Por este motivo, las muestras blandas, como son las muestras biológicas, pueden deformarse irreversiblemente durante el barrido en el modo de contacto.

Además de las fuerzas laterales, las fuerzas capilares también juegan un papel importante. Las moléculas de agua adsorbidas tanto en la superficie como en la punta, generan fuerzas de adhesión laterales debido al movimiento en X de la punta. Estas fuerzas de adhesión que son inevitables cuando se trabaja en aire, se eliminan por completo en medio líquido al estar todo inmerso en agua (Hansma, 1994).

a) Altura constante



b) Deflexión constante



**Figura 1.5. Ilustración de los modos de contacto:** a) altura constante (la deflexión de la micropalanca cambia) y b) deflexión de la micropalanca constante (la altura de la micropalanca cambia).

Si bien este modo de medida se ha utilizado principalmente para caracterizar superficies de materiales (Drake, 1989) también se ha utilizado para biomoléculas con resolución sub-nanométrica (Müller, 1995). Las membranas púrpura estudiadas por el grupo de Müller forman una estructura estable en dos dimensiones que no se dañan al medir en modo contacto.

## 4.2. Modos dinámicos

Los modos dinámicos surgen con la idea de minimizar los daños producidos por el contacto directo entre la punta y la muestra. Para ello, se hace oscilar la micropalanca con un movimiento sinusoidal mientras barre la superficie (Martin, 1987). Esta oscilación se caracteriza por la amplitud y la frecuencia de oscilación y el desfase producido entre la señal de entrada (excitación) y la señal recibida como respuesta de la micropalanca. La frecuencia de la oscilación se hace coincidir con la frecuencia de resonancia libre de la micropalanca para mejorar la sensibilidad y detectar pequeños cambios en la fuerza de interacción entre la punta y la muestra.

La ecuación diferencial que describe el movimiento libre de la micropalanca es:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m w_0}{Q} \frac{dz}{dt} + k z = F_{ts} + F_0 \cos w t \quad (1.6)$$

donde la masa efectiva de la punta se define como  $m = k/(w_0)^2$  con  $k$  la constante de fuerza y  $w_0$  la frecuencia de resonancia libre de la micropalanca. El factor de calidad,  $Q$ , es  $Q = m w / b$ , donde  $w$  es la frecuencia de resonancia de la micropalanca ( $w = 2\pi f$ ) y  $b$ , es el factor de atenuación. El último término se refiere a la fuerza motriz ( $F_0 \cos w t$ ) y el penúltimo,  $F_{ts}$ , a las

fuerzas ejercidas entre la punta y la muestra. Estas últimas tienen distintas contribuciones en función las condiciones de medida (Santos, 2011):

$$F_{ts} = F_a + F_{cap} + F_{ad} + F_{mec} \quad (1.7)$$

donde el primer término,  $F_a$ , hace referencia a las fuerzas de atracción; el segundo término,  $F_{cap}$ , a las fuerzas capilares; el tercer término,  $F_{ad}$ , a las fuerzas de adhesión y el último término,  $F_{mec}$ , a las fuerzas repulsivas debidas al contacto mecánico.

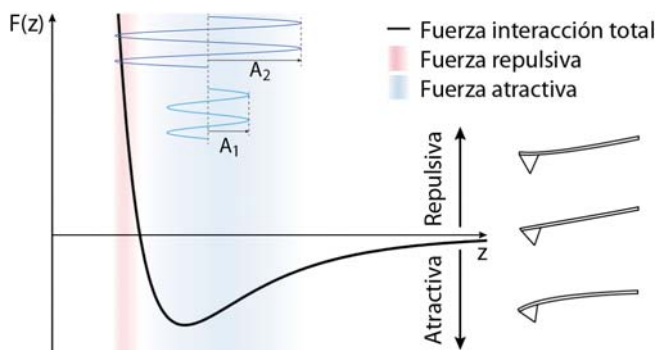
Existen dos modos de medida en función de la variable que se controle por el sistema de realimentación: modulación en amplitud (AM-AFM, *amplitude modulation*) o modulación en frecuencia (FM-AFM, *frequency modulation*).

#### 4.2.1. Modulación en amplitud (AM-AFM) o *tapping*

En el modo de modulación de la amplitud (AM-AFM) el parámetro que controla el sistema de realimentación es la amplitud de la oscilación. La amplitud de la oscilación de la micropalanca depende de la distancia punta-muestra. Existen dos regímenes de trabajo en *tapping*: atractivo y repulsivo. En el régimen atractivo, las fuerzas netas que predominan son las fuerzas atractivas. La punta realiza el barrido sin entrar en contacto directo con la superficie. En algunos casos, este método es también llamado de no-contacto o *close-contact* (Eaton, 2010). En el régimen repulsivo, la punta barre la muestra con un contacto intermitente. Parte de la oscilación se produce en el régimen repulsivo donde la punta está en contacto directo con la superficie, mientras que el resto de la oscilación se produce en el régimen atractivo sin ocasionar contacto. El tiempo que la punta permanece en contacto con la superficie es por tanto muy pequeño y las fuerzas laterales quedan prácticamente eliminadas (Moreno-Herrero, 2000).

La transición entre ambos regímenes depende principalmente de la amplitud y de las propiedades de la muestra (García, 1999). Las propiedades de la muestra no se pueden elegir, pero sin embargo, es posible controlar la amplitud de la oscilación (Eaton, 2010). Por ejemplo, seleccionando una amplitud de trabajo pequeña es más fácil mantenerse en el régimen atractivo, mientras que con amplitudes grandes es posible llegar más fácilmente al régimen repulsivo (ver **Figura 1.6**). Por lo tanto, las condiciones empleadas en cada experimento determinarán el régimen de fuerzas en el que nos encontramos.

Durante el proceso de aproximación de la punta a la superficie se produce una reducción de la amplitud libre hasta alcanzar aproximadamente el 60-75% de la amplitud inicial cuando se entra en el *rango de tapping*. Es entonces cuando se procede a barrer la superficie. Cuando la punta recorre la superficie y se encuentra con un cambio topográfico, la amplitud de la oscilación cambia. Entonces, el sistema de realimentación compensa el cambio de la amplitud reduciendo o aumentando el voltaje que se aplica al tubo piezoeléctrico que mueve la muestra en la dirección vertical y por tanto ajustando la distancia punta-muestra, lo que se traduce en la recuperación de la amplitud de oscilación fijada por el operador.



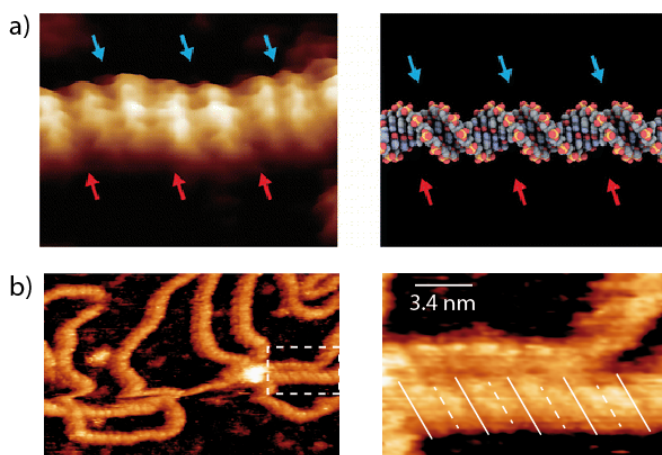
**Figura 1.6. Fuerza de interacción total.** Cuando la amplitud de la oscilación de la micropalanca es pequeña ( $A_1$ ), la oscilación se produce en el régimen atractivo, mientras que con amplitudes mayores ( $A_2$ ) la oscilación se produce tanto en el régimen atractivo como en el repulsivo, provocando un contacto intermitente. A la derecha se muestra la flexión de la micropalanca en cada uno de los regímenes: atractivo, repulsivo y fuerza neta nula.

La mayor parte de los resultados descritos en esta tesis se realizaron empleando el modo dinámico de modulación de la amplitud, trabajando en el régimen atractivo.

#### 4.2.2. Modulación en frecuencias (FM-AFM)

En el modo de modulación en frecuencia (FM-AFM) el parámetro que se mantiene constante durante la adquisición es la frecuencia de la oscilación. Cuando la micropalanca se acerca a la superficie, se produce un desplazamiento en la frecuencia de resonancia. Este desplazamiento causa una reducción en la amplitud, que puede llegar a ser crítica cuando se trabaja en vacío ( $Q_{\text{vacío}} \sim 10^4$ ), puesto que el cambio en frecuencias detectado es inversamente proporcional al factor de calidad,  $Q$  (Albrecht, 1991). Para mantener la micropalanca siempre oscilando a la frecuencia de resonancia se utiliza un sistema de realimentación que mantiene la fase de la señal de salida siempre desfasada  $\pi/2$  respecto a la fase de la señal de entrada. Este sistema de realimentación es también conocido como lazo cerrado en fase o PLL (por sus siglas en inglés, *phase locked loop*). El PLL, por lo tanto, genera una señal de salida cuya fase está siempre desfasada  $\pi/2$  respecto a la señal de referencia, forzando al sistema a trabajar en la frecuencia de resonancia de la micropalanca. Por lo tanto, cuando la micropalanca recorre la superficie y se encuentra con un cambio topográfico o una diferencia en las propiedades físicas, la frecuencia de resonancia cambia. Entonces, el sistema de realimentación compensa el cambio de la frecuencia de resonancia reduciendo o aumentando el voltaje que se aplica al tubo piezoeléctrico hasta ajustar la muestra en el eje vertical, de manera que el valor de la frecuencia de resonancia coincida con el valor introducido por el usuario. La imagen topográfica se obtiene a partir del cambio registrado por el tubo piezoeléctrico.

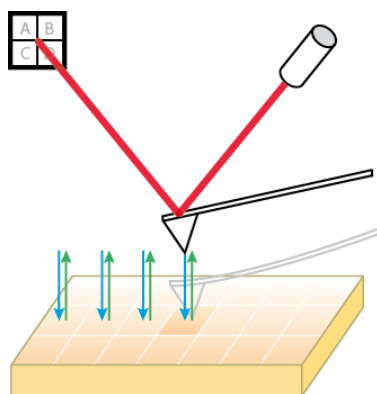
Este modo opera en el régimen atractivo y es también conocido como de no-contacto. Con modulación en frecuencia se obtuvieron las primeras imágenes con verdadera resolución atómica en vacío (Giessibl, 1995). Un ejemplo reciente de una aplicación de este modo a muestras biológicas es la visualización de la doble hélice del DNA (ver **Figura 1.7 (a)**) (Ido, 2013). Estas imágenes han sido reproducidas recientemente con el AFM de Nanotec empleando el método de *tapping* (**Figura 1.7 (b)**) y *jumping*.



**Figura 1.7. Visualización de la doble hélice del DNA con el AFM. a)** Imagen de AFM de una molécula de DNA en líquido observada con FM-AFM (izquierda) y esquema estructural de la molécula de DNA (derecha). En rojo y azul están marcadas las posiciones de los surcos mayores y menores de la molécula. Imagen adaptada de (Ido, 2013). **b)** Imagen de una molécula de DNA en líquido con el AFM de Nanotec operando en modo *tapping*. Las líneas continuas indican la posición de los surcos mayores y las líneas discontinuas los surcos menores. El protocolo seguido para la preparación de la muestra es el mismo que en (Pyne, 2014).

#### 4.3. Modo semi-dinámico o de salto: *Jumping mode* o *force volume*

Este modo surge con la idea de controlar las fuerzas que se ejercen sobre la muestra y combina características del modo de contacto y del dinámico. En cada punto (píxel) de la imagen, la punta se acerca a la superficie hasta que la deflexión (fuerza) llega a un determinado valor. A continuación, la punta se aleja y se mueve lateralmente al siguiente punto de la imagen (ver **Figura 1.8**). Como el movimiento lateral está desacoplado del vertical, el efecto de las fuerzas laterales derivadas del barrido es nulo mientras que la fuerza normal es controlada por el usuario (mediante el valor de la deflexión aplicado). Dado que la punta tiene que alejarse de la superficie venciendo las fuerzas de adhesión y acercarse de nuevo hasta hacer contacto, el tiempo de barrido de este modo es más lento que el del modo dinámico o estático. El ruido del sistema aumenta proporcionalmente con  $1/f$ , donde  $f$  es la frecuencia de barrido (Moreno-Herrero, 2004). Por lo tanto, con frecuencias de barrido pequeñas, el ruido es grande y la relación señal-ruido pequeña.



**Figura 1.8. Esquema del funcionamiento del modo de salto.** La punta se aproxima a la superficie en un punto (flecha azul) hasta que la deflexión de la palanca alcanza un valor determinado por el usuario. A continuación se aleja (flecha verde) y se desplaza lateralmente al siguiente punto.

Dado que este modo permite controlar con gran precisión la fuerza que se ejerce sobre el objeto de estudio, es posible caracterizar las propiedades mecánicas de materiales, como nanotubos de carbono (Moreno-Herrero, 2000) (Gil, 2002) o el grafeno (López-Polín, 2014), y de muestras biológicas como cápsidas víricas (Carrasco, 2008) o partículas vault (Llauró, 2014).

Existen distintas versiones del modo semi-dinámico: *Jumping mode* (JM) (de Pablo, 1998), *Force Volume* (FV) (*Digital Instruments*) y *Pulsed Force Mode* (PFM) (Rosa-Zeiser, 1999). Todos ellos se basan en la misma idea y fueron desarrollados en paralelo por distintos grupos de investigación o compañías. Actualmente se han desarrollado nuevos modos de medida como el DAM (de sus siglas en inglés, *drive amplitud modulation*) (Jaafar, 2012) o el peak-force de la compañía Bruker, con la intención de: 1) controlar mejor las fuerzas que se aplican entre la punta y la muestra, 2) reducir el tiempo de respuesta del sistema de realimentación y 3) reducir el tiempo de adquisición de datos. Esto demuestra que el AFM es una técnica que todavía está en desarrollo 25 años después de su descubrimiento.

## 5. AFM de alta velocidad

Uno de los retos del AFM es observar procesos dinámicos biológicos que tienen lugar en tiempos del orden de milisegundos. El grupo japonés del Prof. Toshio Ando ha sido pionero en AFMs de alta velocidad. Ha conseguido obtener una imagen por debajo de los 100 ms y ha observado varios sistemas biológicos, como por ejemplo, el movimiento de la miosina V por un filamento de actina o el cambio conformacional de la bacteriorodopsina cuando se excita con luz verde (Ando, 2012b).

Hay tres elementos clave que limitan la velocidad de operación y adquisición de un AFM: el piezo que hace el movimiento en el eje Z, el sistema de realimentación o *feedback* y la frecuencia de resonancia de la micropalanca (Hansma, 2006). El primero de ellos, **el piezo que realiza el movimiento en Z**, debe tener una frecuencia de resonancia elevada para responder rápidamente a los cambios en la topografía. Disminuir la masa del piezo es una estrategia para conseguir frecuencias de resonancia mayores, pero a cambio se reduce su rango de desplazamiento. Por esto, es necesario combinar piezos grandes que tienen rangos mayores y permiten acercarse sin dañar la punta y corregir la inclinación de la muestra, con piezos pequeños para hacer el movimiento rápido en Z una vez que se llega a la superficie. El segundo componente importante es el **sistema de realimentación**. El sistema de realimentación detecta las interacciones de la punta y la muestra y corrige la posición entre ambas a medida que registra la topografía con precisión. Si la realimentación no se hace suficientemente rápido, la sonda no recorrerá bien la superficie. Para asegurar una buena realimentación el ancho de banda del lazo que se realimenta ha de ser comparable, o mayor, a la frecuencia asociada a la velocidad de barrido en el plano XY (Ando, 2001). Y por último, la **frecuencia de resonancia de la micropalanca**. Como ocurre con el piezo, aumentar la frecuencia de resonancia de la palanca se consigue reduciendo su masa. En la actualidad, se han desarrollado puntas comerciales con frecuencias de resonancia del orden de los GHz que permiten medir a velocidades de 5-7 imágenes (80 x 40 píxeles) por segundo (Kodera, 2010).

## 6. Elección de la micropalanca

La elección de la micropalanca es una decisión clave a la hora de tener éxito en un experimento. Hoy en día, existen varias empresas que fabrican micropalancas de AFM con diferentes características. Algunas de las más importantes son la forma: se pueden distinguir entre triangulares (TR), rectangulares (RC) o piramidales (PR); la composición: las más duras suelen ser de silicio (Si) y las más blandas de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ); la constante de fuerza: entre las más blandas 0,01 N/m a las más duras 100 N/m; en cuanto a la frecuencia de resonancia: entre 5 kHz a 1MHz.

Cada uno de los modos de medida requiere de un tipo de micropalanca para conseguir un rendimiento óptimo. Por ejemplo, cuando se utiliza el modo contacto, tanto en líquido como en aire, la micropalanca ha de ser lo más blanda posible para no dañar la muestra. Cuando se utiliza el modo dinámico con modulación en amplitud se pueden distinguir dos casos: en líquido, la constante de fuerza ha de ser pequeña para dañar la muestra lo menos posible (0,01-0,1 N/m), mientras que el aire, la constante de fuerza ha de ser mayor para poder vencer las fuerzas capilares (20-100 N/m). En el caso del modo dinámico con modulación en frecuencia, lo más importante es que tenga un pico de resonancia bien definido con un factor de calidad elevado ( $Q \sim 10^4$ ), etc. (García, 2002).

En la **Tabla 1.1** se muestran las especificaciones de las micropalancas que se han utilizado a lo largo de esta tesis.

**Tabla 1.1. Especificaciones del fabricante de las puntas utilizadas en la tesis.** Forma (F), Grosor (G), Ancho por Largo (A x L), Radio de la punta ( $R_p$ ), constante de fuerza (k), Frecuencia de resonancia ( $F_r$ ) y Material de la punta ( $M_p$ ). \*Abreviaturas de la forma: RC para micropalancas rectangulares, TR para triangulares y PR para piramidales o tetraédricas. \*\*La mayor parte de las micropalancas están recubiertas por una capa de metal (oro, cobre, aluminio) para mejorar la reflexión del láser sobre su superficie. Al lado del nombre en superíndices se indica el número del capítulo donde han sido utilizadas.

	F *	G	A x L	$R_p$	K	$F_r$	$M_p$ **
Aire							
<b>PPP-NCH<sup>2,5</sup></b> (Nanosensors)	PR	4 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$ x 125 $\mu\text{m}$	< 7 nm	42 N/m	260 kHz	Si
<b>Ultrasharp<sup>2,3</sup></b> (Nanoscience Instruments)	PR	4.5 $\mu\text{m}$	35 $\mu\text{m}$ x 125 $\mu\text{m}$	< 4 nm	40 N/m	300 kHz	Si
Líquido							
<b>OMCL- TR400PSA<sup>5</sup></b> (Olympus)	TR	400 nm	- x 100 $\mu\text{m}$	15 nm	0.08 N/m	34 kHz (aire)	$\text{Si}_3\text{N}_4$
<b>OMCL- RC800PSA<sup>5</sup></b> (Olympus)	RC	800 nm	20 x 200 $\mu\text{m}$	15 nm	0.05 N/m	18 kHz (aire)	$\text{Si}_3\text{N}_4$
<b>Biolever<sup>5</sup></b> (Olympus)	RC	180 nm	30 x 60 $\mu\text{m}$	30 nm	0.03 N/m	37 kHz (aire)	$\text{Si}_3\text{N}_4$

La mayor parte de los experimentos descritos en esta tesis fueron realizados con las micropalancas PPP-NCH (Nanosensors). Estas palancas poseen una  $f_r \sim 300$  kHz y  $k \sim 40$  N/m. Algunos ejemplos de resultados obtenidos con estas palancas se pueden encontrar en (Fuentes-Perez, 2012).

## 7. Resolución del AFM

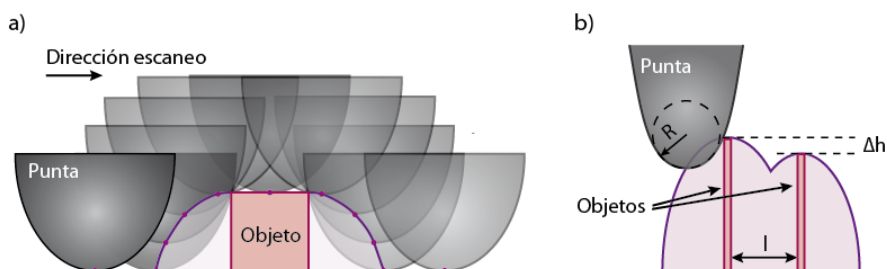
Una de las características más importantes de cualquier microscopio es su resolución. Mientras que en un microscopio óptico la resolución viene dada por la distancia mínima con la que se puede resolver dos puntos, en un AFM que proporciona imágenes topográficas en tres dimensiones, el concepto de resolución es distinto.

De manera general se puede diferenciar la resolución lateral y la resolución vertical, además de la **resolución instrumental** (área en nm por píxel).



La **resolución lateral** se puede asemejar con el concepto clásico de resolución en un microscopio óptico. En el caso del AFM depende del tamaño de la punta, de las interacciones que se producen entre la punta y la muestra así como de la separación entre la punta y la muestra (García, 2002).

Dado que el AFM utiliza una punta como sonda para barrer la superficie, la imagen se ve afectada por un efecto de dilación, que es la convolución entre la punta y la muestra. De esta manera, el objeto a estudiar aparece más ancho que su tamaño real tal y como se observa en la **Figura 1.9 (a)**.



**Figura 1.9. a) Ilustración del efecto de la dilación y b) la resolución lateral.** La línea morada muestra la trayectoria de una punta esférica cuando escanea un objeto adsorbido en la superficie. El objeto conserva la altura real, mientras que la anchura es mayor por el efecto de la convolución. Los parámetros mostrados en b) son:  $R$ , el radio de la punta;  $l$ , la distancia entre dos objetos y  $\Delta h$  la diferencia de altura entre ambos.

Por ejemplo, la resolución lateral entre dos objetos empleando una punta parabólica con radio  $R$ , viene definida como:

$$l = \sqrt{2R} \left( \sqrt{\delta z} + \sqrt{\delta z + \Delta h} \right) \quad (1.8)$$

donde  $\delta z$  es la resolución en altura (**Ec. 1.9**) y  $\Delta h$  es la diferencia de altura entre los dos objetos (**Figura 1.9 (b)**) (Martínez, 2011).

A pesar de que existen algoritmos para desconvolucionar objetos (Villarrubia, 1994) (Yuan, 2013), existen muchos inconvenientes a la hora de aplicarlos al AFM. En primer lugar, la convolución depende de la geometría de la punta y resulta difícil estimarla con precisión, además de que la punta puede evolucionar a lo largo del experimento y hacerse más grande por contaminación con el medio. En segundo lugar, la convolución no es un efecto lineal y por lo tanto puede dar lugar a otros artefactos en la imagen. Y por último, hay que tener en cuenta que hay partes del objeto que nunca se podrán ver debido a la geometría de la punta (como por ejemplo el hemisferio sur de una muestra esférica) (Smela, 1999).

La **resolución vertical** está limitada tanto por el ruido procedente del sistema de detección como por el ruido térmico de la micropalanca:

$$\delta z = \sqrt{\delta z_{\text{térmico}}^2 + \delta z_{\text{detección}}^2} \quad (1.9)$$

De manera general, el ruido térmico de la micropalanca suele ser la mayor fuente de ruido del AFM, y en el caso de que la deflexión de la micropalanca se mida con un sistema de fotodetección, como es nuestro caso, viene dado por:

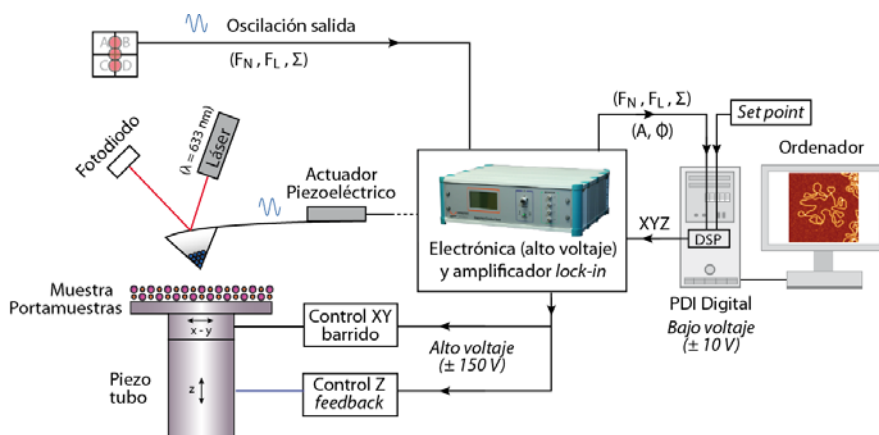
$$\delta z_{\text{térmico}} = \sqrt{\frac{4k_B T}{3k}} = \frac{0.074 \text{ nm}}{\sqrt{k}} \quad (1.10)$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann ( $1.38 \cdot 10^{-23}$  J/K),  $k$  es la constante de fuerza de la micropalanca (en N/m), y  $T$  la temperatura absoluta (en K). Para una micropalanca típica de aire, con una constante de fuerza de 40 N/m a temperatura ambiente (295 K), las fluctuaciones térmicas están por debajo de 0.01 nm. Para una micropalanca típica de líquido ( $k \sim 0.05$  N/m, 295 K) las fluctuaciones térmicas  $\sim 0.3$  nm.

## 8. Componentes de nuestro AFM

El microscopio utilizado en esta tesis es un aparato comercial de la empresa Nanotec Electrónica S.L (Madrid, España). Este AFM consta de cuatro componentes principales que se muestran en la **Figura 1.10** y se detallan a continuación:

- La cabeza del AFM donde se encuentra el láser, el fotodiodo y el soporte para colocar la micropalanca. En el soporte de la micropalanca se encuentra un pequeño piezo que se encarga de excitar acústicamente la micropalanca para hacerla oscilar a su frecuencia de resonancia. El láser utilizado es un láser de fibra (Schäfter + Kirchhoff, Alemania) cuya longitud de onda de emisión es de 633 nm. La cabeza se coloca sobre tres tornillos micrométricos. Dos de ellos permiten un ajuste con precisión micrométrica de la distancia de la cabeza a la superficie. El tercero se controla con un motor para facilitar el acercamiento automático a la superficie.
- El tubo piezoeléctrico se encarga de mover la muestra en el plano XY y en la dirección Z. Estos piezos permiten movimientos con precisión nanométrica. Sobre este tubo piezoeléctrico se coloca el portamuestras.
- La electrónica es la unidad de control que procesa las señales que llegan del fotodiodo y envía las señales correspondientes al DSP y al piezo (alto voltaje). Dentro de la electrónica se encuentra el amplificador *lock-in*, que obtiene la amplitud y la fase de la señal procesada.
- El ordenador contiene un procesador digital de la señal o DSP (de las siglas en inglés *Digital Signal Processor*) que procesa las señales que le llegan de la electrónica y realiza el *feedback* (controlador PDI digital, de las siglas en inglés, *proportional-integral-derivative*). El software WSxM (Horcas, 2007) permite controlar los parámetros relacionados con la adquisición de las imágenes en tiempo real, así como la visualización de la imagen también en tiempo real.



**Figura 1.10. Esquema básico de un AFM.** El movimiento de la punta se recoge en el fotodiodo gracias a un haz láser que se refleja sobre el extremo voladizo de la micropalanca. La señal del fotodiodo se analiza en la electrónica donde se encuentra el amplificador *lock-in* que manda la amplitud,  $A$ , y fase de la oscilación,  $\phi$ , de la micropalanca junto con la fuerza normal,  $F_N$ , fuerza lateral,  $F_L$ , y la suma de intensidad,  $\Sigma$ , al DSP donde se realiza el *feedback* digital. Los nuevos valores se envían a la electrónica que manda la nueva señal corregida al piezo para continuar con el barrido. En el ordenador se controlan los parámetros de la adquisición de imágenes a la vez que se visualiza en tiempo real la imagen adquirida.

La cabeza del AFM y el tubo piezoeléctrico están situados en el interior de una caja que aísla acústicamente, y a su vez, la caja está colocada sobre una mesa óptica que aísla el sistema del ruido mecánico gracias a un sistema de suspensión neumática. Ambos aislamientos son importantes para filtrar en la medida de lo posible los ruidos externos.

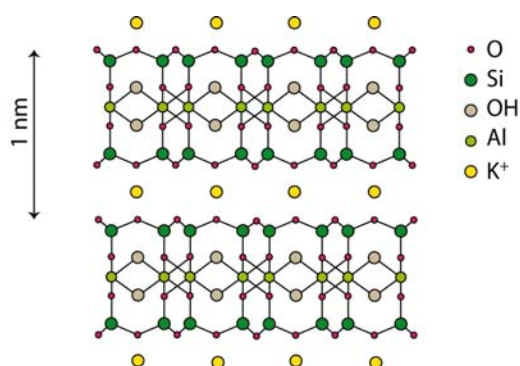
## 9. Preparación de los experimentos, adquisición y procesamiento de las imágenes

### 9.1. Superficies y preparación de las muestras

Dado que el AFM no requiere de una superficie conductora, como ocurre en el caso del STM, existen varias superficies aptas para depositar material biológico sobre ellas. La superficie debe de cumplir una serie de características: primero, la rugosidad debe de ser menor que la altura de las biomoléculas que se quieran observar; segundo, debe permitir una interacción suficientemente fuerte con el material biológico de manera que no le afecte el barrido con la punta; y tercero, debe poderse limpiar y preparar de una manera reproducible para todos los experimentos (Thomson, 2007). Las superficies más utilizadas que cumplen estos requisitos son: mica, grafito (HOPG), oro (Au111) y vidrio (El Kirat, 2005). Todas ellas se colocan adheridas a un por-

tamuestras, generalmente metálico, que se acopla con la ayuda de unos imanes encima del tubo piezoeléctrico.

La mica es un mineral aislante que pertenece al grupo de los filosilicatos, constituido por silicatos de potasio y aluminio y que puede contener además magnesio, hierro, manganeso y litio, entre otros. La mica más comúnmente utilizada para el AFM es la mica moscovita y es ésta la que se ha utilizado durante el desarrollo de la tesis. Está compuesta por un tetraedro de silicio y un octaedro de aluminio unidos covalentemente formando láminas planas de 1 nm de grosor, que a su vez están débilmente unidas por iones de potasio ( $K^+$ ) (ver **Figura 1.11**) (Thomson, 2007). Esta estructura cristalina en forma de láminas delgadas, flexibles y brillantes, permite una exfoliación sencilla de la superficie. Poniendo una cinta adhesiva sobre la cara descubierta de la mica y retirándola con cuidado se obtiene una superficie atómicamente plana y limpia cada vez.



**Figura 1.11.** Estructura atómica de la mica. Esquema basado en (Miyake, 1995).

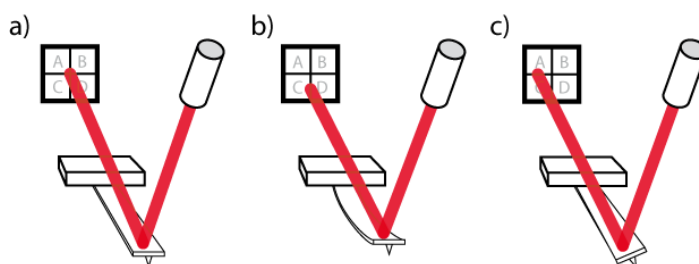
Cuando la mica está inmersa en una solución acuosa, los iones de potasio difunden, siendo éstos reemplazados por una nube de contraiones (Thomson, 2007). Esto le confiere una carga negativa a la superficie que permite que moléculas con carga positiva puedan adherirse a ella. En el caso de moléculas con carga negativa, como por ejemplo el DNA, existen distintas estrategias para cambiar la carga de la mica. La más común consiste en introducir iones divalentes positivos en la reacción de manera que hagan de puente electrostático entre la superficie y la molécula (Pastre, 2003). Se ha demostrado que diferentes iones divalentes tienen distinta eficacia a la hora de adsorber moléculas de DNA. El ión divalente más usado es el magnesio, aunque también se han descrito trabajos con manganeso, zinc, cobalto o níquel entre otros (Hansma, 1996). También existen otros métodos para cambiar la carga y propiedades de adhesión de la mica realizando pre-tratamientos en su superficie. Los pre-tratamientos más comunes se basan en el uso de poliaminas, como la espermina o la espermidina, el uso de poliaminoácidos, como la polilisina, el uso de cationes divalentes, como magnesio o níquel, o el uso de químicos de silano, como el *3-aminopropyl-triethoxysilane* (APTES). La funcionalización de la mica con estos pretratamientos es sencilla. Para ello, se

depositan unos microlitros de una solución acuosa que contenga el componente seleccionado sobre la superficie de la mica previamente exfoliada, se dejan durante unos minutos, se lava con agua y se seca con nitrógeno gaseoso comprimido.

Una vez que la mica está preparada para adsorber las biomoléculas correspondientes, se procede a depositar sobre ella unos microlitros de una solución acuosa que contiene a la biomolécula a estudiar. Se dejan desde unos segundos hasta unos minutos y se procede a lavar con agua y secar con nitrógeno, en caso de que vayamos a observar la muestra en aire. Cuando se quiere tomar las imágenes en medio líquido, la mica se coloca en un pequeño recipiente con capacidad para un mililitro del líquido, que se añade directamente sobre los microlitros de la reacción depositados previamente en la mica.

## 9.2. Puesta a punto del AFM y aproximación

El chip que contiene la micropalanca se coloca en el portamicropalancas en una plataforma diseñada específicamente para ello. El chip se puede pegar o fijar a un extremo de la plataforma de diversas maneras: con pintura de plata, con grasa de vacío o con una goma que lo sujeta mecánicamente al soporte de la micropalanca. En el extremo opuesto de la plataforma se coloca solidario un piezo que se encarga de excitar acústicamente la micropalanca.



**Figura 1.12. Detección del movimiento de la micropalanca.** Un haz láser se refleja en el extremo final voladizo de la micropalanca

Una vez que la micropalanca está bien sujeta al portamicropalancas, se procede a enfocar el láser sobre el extremo final voladizo de la micropalanca y cuya reflexión se recoge en un fotodiodo de cuatro cuadrantes. Este paso es muy importante dado que el AFM utiliza la deflexión de la micropalanca para obtener los parámetros del sistema de realimentación (ver **Figura 1.12**). La cabeza del AFM está diseñada de tal forma que permite enfocar el láser en la micropalanca con un *spot* del orden de unas pocas decenas de micras, que coincide con el tamaño característico de las micropalancas comerciales.

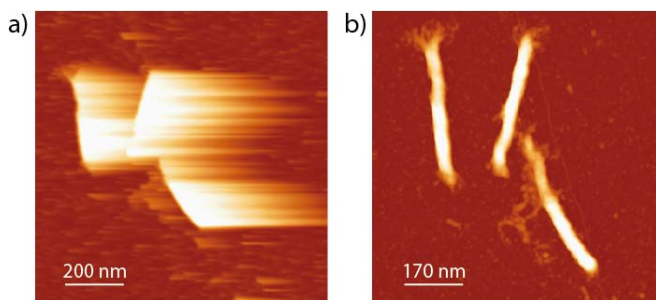
Actualmente el desarrollo de AFM ultrarápidos requiere el uso de micropalancas muy pequeñas (Ando, 2007). Estas micropalancas alcanzan frecuencias de resonancia de GHz manteniendo la misma constante de fuerza de 0.1

N/m (Ando, 2012a). El uso de estas palancas requiere una óptica que permita focalizar el láser en un *spot* pequeño de forma, que toda la luz sea reflejada en la micropalanca y recogida por el fotodiodo. Para ello, la empresa Nanotec en colaboración con el grupo de Moreno-Herrero junto con el laboratorio de Nuevas Microscopías de la UAM, desarrollaron una nueva cabeza llamada Lanza, que permite enfocar el láser en un *spot* de unas 10-20  $\mu\text{m}$ .

Después de enfocar el láser sobre la micropalanca se procede a colocar la cabeza sobre los tres tornillos micrométricos. Primero se ajustan los dos tornillos delanteros a mano y se deja libre el tercer tornillo micrométrico que utilizaremos más adelante para acercarnos. Con la ayuda del software se localiza la frecuencia de resonancia propia del cantiléver. A continuación, se elige la amplitud de la oscilación y se procede con el acercamiento de la punta a la superficie. Para ello se utiliza el motor situado en el tercer tornillo micrométrico desde el que nos aproximaremos con una velocidad de 6  $\mu\text{m/s}$ . Un descenso de la amplitud indica que la punta está llegando a la superficie. Entonces, se detiene el movimiento del motor y se continúa con la aproximación de forma más controlada y precisa, realizando pequeños movimientos con el motor hasta llegar al *rango del tapping*.

### 9.3. Adquisición de imágenes

Durante la adquisición de las imágenes con el AFM es necesario ajustar los parámetros del *feedback* y el *set point*. El *feedback* puede cambiar de un experimento a otro y su valor debe ser el máximo posible que no introduzca ruido en la imagen. El *set point* es un valor de control introducido por el usuario para controlar el parámetro sobre el que se hace el *feedback* (amplitud, fuerza, frecuencia, etc.). Por lo tanto, cambiando el valor del *set point*, el sistema de realimentación aplicará un mayor o menor voltaje al tubo piezoeléctrico para acercar o alejar la punta a la superficie. Es importante que la punta sea capaz de seguir la topografía de las moléculas cuando barre la superficie para evitar efectos como los que se muestran en la **Figura 1.13**.

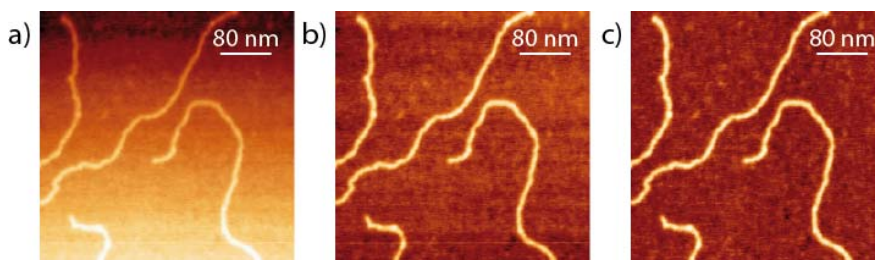


**Figura 1.13. Elección de los parámetros de realimentación.** Imagen de AFM de fibras de RepA. En **a)** no se ha ajustado bien el valor del *set point* y se observa que la punta no llega a medir la superficie hasta pasado un tiempo, creando un artefacto conocido como *parachuting* (Ando, 2008). En **b)** el *set point* se ha ajustado adecuadamente y se observan las fibras de RepA.

También es importante ajustar otros parámetros para obtener una resolución instrumental razonable como el tamaño de la imagen, el número de puntos (por lo general 512 para las imágenes tomadas en aire y 256 para las imágenes tomadas en líquido) o la frecuencia de barrido (entre 0.3 o 3 Hz).

## 9.4. Procesamiento de las imágenes

El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el mismo software utilizado para la adquisición de las mismas. El software WSxM (Horcas, 2007) permite procesar las imágenes de AFM aplicándoles diferentes filtros. De manera general, el primer filtro que se aplicó fue la substracción de un plano global seguido de un ajuste de la superficie a una ecuación de segundo grado. Este paso elimina cualquier inclinación de la mica o efecto del movimiento curvo del piezo al tomar la imagen. A continuación se aplicó el filtro *flatten* en la imagen, descartando todas las zonas que contienen a la muestra. Este filtro resta a cada línea la altura media de la línea. Por lo tanto, si en una región hay un cambio topográfico brusco, la altura media de la línea será mayor y la superficie parecerá más baja (más oscura) de lo que realmente es. Sin embargo, este efecto no es real, sino que es un artefacto que hay que corregir. Durante el desarrollo de esta tesis, Nanotec desarrolló una nueva herramienta de *flatten* llamada *Flatten Plus*, con la que ya no es necesario seleccionar a mano todos los objetos de la imagen para hacer el *flatten*, sino que el programa hace un *flooding* y descarta todos aquellos puntos que estén por encima del plano de la imagen. Los distintos procesos en el tratamiento de las imágenes se pueden ver en la **Figura 1.14**.



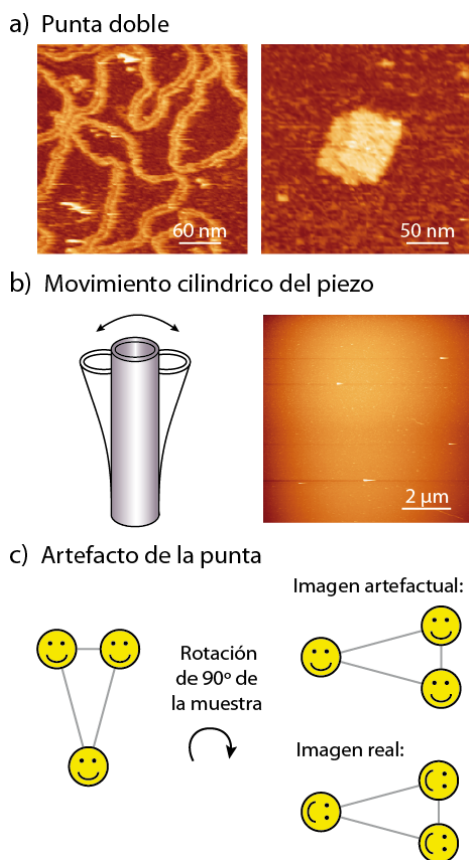
**Figura 1.14. Tratamiento de las imágenes.** (Imagen de moléculas de DNA como ejemplo) **a)** Imagen proporcionada por el AFM. Se puede observar la inclinación de la superficie, parte superior (más oscura) más baja y parte inferior (más brillante) más alta. **b)** Substracción de un plano global y ajuste de la superficie a una ecuación de segundo grado. **c)** Aplicación del *flatten*.

### 9.4.1. Artefactos de la imagen

Los artefactos en la imagen se pueden producir por diferentes motivos. Los más habituales provienen de la punta y/o del piezo, pero también pueden ser artefactos debidos a un mal sistema de aislamiento mecano-acústico, procedente de la electrónica o incluso debido al procesamiento de las imágenes. Los artefactos más comunes se detallan a continuación:



- La punta doble es uno de los casos más fáciles de detectar, debido a que el objeto aparece repetido en la imagen como una sombra (ver **Figura 1.15 (a)**). Ocurre generalmente cuando la punta resulta dañada durante el acercamiento o durante el barrido. También puede ocurrir por la adhesión de algún elemento de la muestra en la punta. Este artefacto se soluciona bien haciendo una curva de fuerza frente a distancia para intentar limpiar la punta, o bien cambiando la punta por una nueva.



**Figura 1.15. Posibles artefactos en las imágenes de AFM. a)** Ejemplo de punta doble en una molécula de DNA o en una estructura de DNA origami. **b)** Curvatura en la superficie producida por el movimiento del piezo. **c)** Artefacto debido a la punta.

- El *creep* tiene que ver con la histéresis del piezo. Cuando el piezo se está moviendo, tiene una cierta inercia y por lo tanto tarda en cambiar de dirección. Este cambio de dirección se puede suavizar con unos parámetros del AFM (*round percent*). El efecto del *creep* se puede ver cuando la ida y la vuelta de una misma imagen no coinciden, sino que están un poco desfasadas.



- El *drift* o deriva está relacionado con pequeños movimientos de algún componente del sistema, como por ejemplo, si la punta o la muestra no están bien fijadas. Otro ejemplo de *drift* es el térmico, que se produce por cambios de temperatura y generalmente afecta al piezo. El *drift* es importante tenerlo en cuenta a la hora de medir distancias en la imagen, dado que es posible que las distancias aparezcan distorsionadas. Este artefacto se soluciona bien fijando fuertemente el elemento que no esté bien inmovilizado (punta o muestra) o bien dejando que el sistema se estabilice térmicamente durante el tiempo necesario (puede tardar desde minutos hasta horas, cuando se trabaja en medio líquido).
- Cuando se barren áreas grandes, se puede observar el movimiento cilíndrico del piezo (**Figura 1.15 (b)**). Esto es debido a que el piezo tubo tiene forma de cilindro y al barrer áreas grandes se curva, creando una imagen más alta por el centro que por los lados. Este efecto es fácil corregirlo substrayendo el plano curvo medio de la imagen.

Para comprobar que lo que estamos observando son artefactos y no características reales, se pueden hacer algunas comprobaciones como por ejemplo: repetir la imagen para comprobar que el artefacto no vuelve a aparecer, cambiar la dirección o velocidad de barrido y tomar una nueva imagen, cambiar el tamaño de la imagen para comprobar que todo escala adecuadamente, etc. (**Figura 1.15 (c)**).

## 10. AFM aplicado a la biología

A partir de las imágenes de AFM es posible extraer información de una gran variedad de sistemas biológicos entre los que se incluyen: ácidos nucleicos (Hansma, 1995) (De Pablo, 2000), virus (Carrasco, 2008), proteínas de membrana (Scheuring, 2003), cambios conformacionales de proteínas (Mertens, 2012), interacciones entre proteínas (Fuentes-Perez, 2012), entre proteína y DNA (Rivetti, 1999) (Hansma, 2001), (Moreno-Herrero, 2005) o entre proteínas y capas lipídicas (Encinar, 2013), movimiento de proteínas en microtúbulos (Schaap, 2011), estiramiento de proteínas (Garcia-Manyes, 2007) (Alegre-Cebollada, 2014), células (Müller, 2011), etc.

En esta tesis nos vamos a centrar en tres casos particulares: medida de propiedades mecánicas de ácidos nucleicos, DNA y RNA (**Capítulo 2**); desarrollo de una técnica para medir volúmenes a partir de imágenes AFM aplicado a proteínas y ácidos nucleicos (**Capítulo 3**); y caracterización de la interacción proteína:DNA de las proteínas iniciadoras de la replicación en plásmidos y la formación de estructuras amiloides (**Capítulo 4**). También comentaremos más brevemente aplicaciones a otras nanoestructuras como son el DNA origami, proteínas que forman fibras (como TubZ) y la interacción entre el péptido KF y el DNA (**Capítulo 5**).



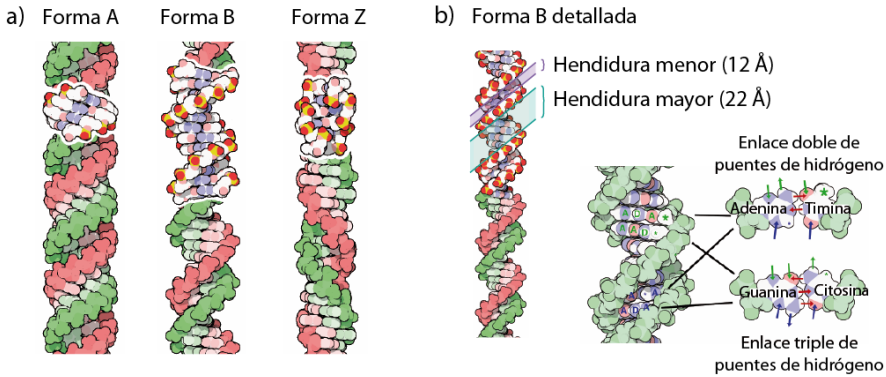
## 2. Propiedades Mecánicas de Ácidos Nucleicos: DNA y RNA

### 1. Introducción a los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos han sido objeto de estudio desde que el químico Friedrich Miescher los descubrió y aisló en 1869 (Bowater, 2005). Sin embargo, no fue hasta mediados del siglo XX cuando el DNA fue aceptado como material genético. La estructura de la molécula de DNA también trajo mucha controversia entre distintos grupos del mundo que competían por resolverla. Finalmente, James Watson y Francis Crick revelaron su estructura mediante experimentos de difracción de rayos-X en 1953 (Watson, 1953) y junto con Maurice Wilkins consiguieron el premio Nobel de Medicina en 1962 (Bowater, 2005).

El DNA de doble hebra es la molécula elegida por muchos organismos para codificar la información genética. Sin embargo, el DNA solo representa el 15% de los ácidos nucleicos en bacterias como *E. coli* y el 18,5% en mamíferos (Alberts, 2010). El RNA es mucho más abundante en los organismos. Además de conservar el material genético de algunos virus en su forma de hebra doble o sencilla, está implicado en la regulación de muchos procesos del ciclo celular tanto en células eucariotas como procariotas. Hay diferentes tipos de moléculas de RNA de hebra sencilla que desempeñan funciones diferentes: el RNA mensajero (RNAm), también conocido como codificante, es el encargado de transportar la información genética desde el DNA al ribosoma. Entre los no codificantes se encuentra el RNA de transferencia (RNAt), que se encarga de transportar aminoácidos desde el citoplasma hasta el ribosoma, y el RNA ribosómico (RNAr), que compone el 80% del ribosoma y actúa como

componente catalítico del mismo. También existen otros RNAs no codificantes que catalizan reacciones necesarias para el ciclo celular. El RNA de cadena doble es una molécula menos frecuente que el de cadena sencilla y está implicado en la regulación de genes en organismos eucariotas (Wagner, 1989) (Meister, 2004).



**Figura 2.1. Estructura del DNA.** a) Diferentes formas estructurales que adoptan las moléculas de DNA. b) Detalle de la forma B. Figura adaptada de (Goodsell, 2011)

La estructura de las moléculas de doble hebra de DNA y de RNA conserva muchos elementos en común. Ambas son cadenas poliméricas en las que los nucleótidos están unidos covalentemente entre sí mediante enlaces fosodiéster entre el grupo fosfato unido al azúcar de un nucleótido y un grupo hidroxilo del azúcar del siguiente nucleótido (Alberts, 2010). La diferencia entre el DNA y el RNA es el tipo de azúcar presente en su esqueleto azúcar-fosfato: si es una desoxirribosa (contiene las bases A (adenina), C (citosina), G (guanina) y T (timina)) es un DNA, mientras que si es una ribosa (contiene las bases A, C, G y U (uracilo)) es un RNA. Una característica importante de los ácidos nucleicos de doble hebra es la disposición de las bases de manera que AT forma un enlace doble de hidrógeno y CG forman un enlace triple.

Sin embargo, la estructura secundaria que adoptan estas moléculas bicatenarias en condiciones fisiológicas es diferente: el DNA adopta la forma B y el RNA adopta la forma A. Los primeros estudios de difracción de rayos X revelaron que el DNA es una molécula polimórfica que puede adquirir distintas formas estructurales (ver **Figura 2.1**): la forma B en condiciones fisiológicas (alta humedad) y la forma A en condiciones de baja humedad (Hormeno, 2011). Posteriormente, se encontraron otras formas menos frecuentes como la Z, en la que el DNA es más estrecho y elongado que en la forma B, o la postulada forma S que adoptaría el DNA cuando es sometido a tensión. El RNA por el contrario, se encuentra siempre en forma A. En la **Tabla 2.1** se presentan los principales parámetros estructurales de las formas secundarias del DNA: A, B y Z (Saenger, 1984) (Watson, 2004) (Neidle, 2010).

**Tabla 2.1.** Comparación de los parámetros estructurales de las tres formas secundarias que adopta el DNA: forma A, forma B y forma Z.

	Tipo de hélice		
	Forma A	Forma B	Forma Z
<b>Sentido de la rotación</b>	Derecha	Derecha	Izquierda
<b>Diámetro hélice</b>	2.55 nm	2.37 nm	1.84 nm
<b>Ascenso en bp por vuelta hélice</b>	2.3 Å	3.32 Å	3.8 Å
<b>bp por vuelta hélice</b>	11	10,5	12
<b>Inclinación de las bases respecto a la normal al eje</b>	+19°	-1,2°	-9°

## 1.1. Ácidos nucleicos con el AFM

El AFM es una técnica excelente para observar ácidos nucleicos por varios motivos. Primero, porque son moléculas estables, que mantienen su estructura secundaria una vez adheridas a la superficie bajo condiciones adecuadas. Y segundo, porque su geometría, como hilo unidimensional, las hace fácilmente distinguibles de otras moléculas o artefactos de la superficie.

A continuación vamos a comentar dos de los aspectos más importantes a tener en cuenta cuando se observan ácidos nucleicos por microscopía de fuerzas: la altura y el modo de adsorción en la mica.

### 1.1.1. Altura de las moléculas de DNA

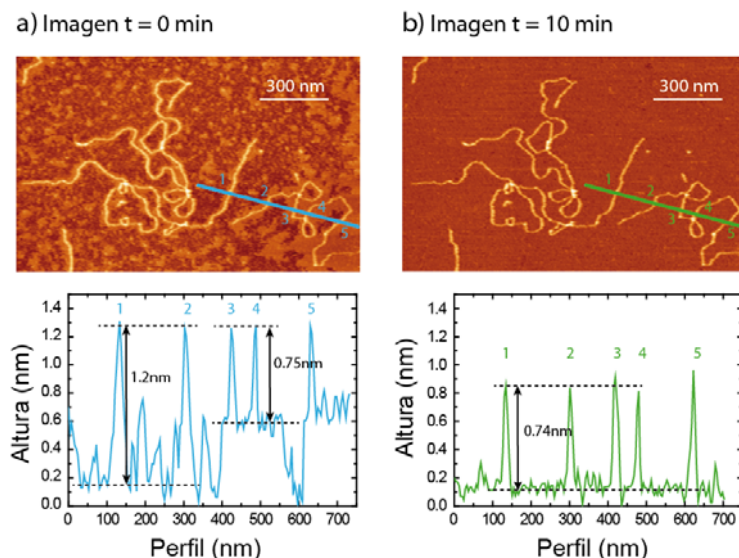
En aire la altura de las moléculas de DNA medida con el AFM está lejos de alcanzar el valor del diámetro cristalográfico, que es de 2.37 nm. En la bibliografía el valor de la altura típica de una molécula de DNA en aire es de 1 nm.

La altura del DNA depende de la fuerza aplicada con la punta y de la humedad relativa. Un estudio en el grupo de Carlos Bustamante demuestra que aplicando la misma fuerza, la altura del DNA es mayor cuando la humedad es menor (5%) que cuando la humedad es mayor (23%) (Yang, 1996).

Hay estudios que justifican esta reducción de la altura con la formación de una capa de sal que entierra la molécula de DNA en la superficie, reduciendo así la altura medible (Moreno-Herrero, 2003). También la adsorción de una capa de moléculas de agua en la superficie o el efecto de la deshidratación de la molécula podría afectar a la altura.

Los efectos de secado a la hora de preparar la muestra afectan a la altura de los objetos en la escala nanométrica. En ciertas ocasiones, hemos observado que hay un cambio topográfico en la superficie durante los primeros 10 minutos de empezar el experimento, como se muestra en la **Figura 2.2**. Este cambio topográfico podría relacionarse con la adsorción de la bicapa de agua

en la mica debido a las condiciones ambientales en las que trabajamos (30% humedad relativa). La altura de una bicapa de agua adsorbida en una superficie hidrofílica, como es el caso de la mica, se estima en torno a 0.6 nm (Santos, 2011).



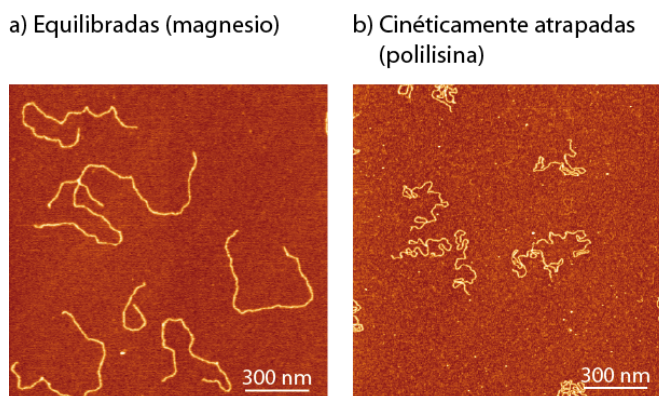
**Figura 2.2. Posible capa de agua en la superficie de la mica.** Imágenes de AFM (arriba) y los correspondientes perfiles (abajo) de un experimento de DNA en mica (fijado con magnesio). **a)** Primera imagen tomada del experimento y **b)** imagen de la misma zona tomada 10 minutos después. Se especula que esta capa podría corresponder con la adsorción de una doble capa de agua.

En líquido las moléculas de DNA están hidratadas y la capa de sales está diluida en el líquido. Por lo tanto, la altura de las moléculas de DNA es 2 nm.

### 1.1.2. Moléculas equilibradas y cinéticamente atrapadas

Cuando las moléculas de DNA se adsorben en una superficie pueden adquirir distintas conformaciones. Los dos extremos opuestos de adsorción de moléculas se conocen como moléculas equilibradas o cinéticamente atrapadas. En la primera situación, las moléculas que se unen a la superficie son libres para moverse en el plano hasta alcanzar una conformación de mínima energía en 2-Dimensiones. La conformación que adquieren en 2D es energéticamente equivalente a la que tienen las moléculas en 3D cuando están en líquido. En este caso, se dice que las moléculas se encuentran **equilibradas** en la superficie. En el segundo caso, las moléculas que se adsorben a la superficie no son libres para equilibrarse y se quedan irreversiblemente unidas a la superficie en el momento que hacen contacto. En este caso, se dice que las moléculas están **cinéticamente atrapadas** en la superficie. En la **Figura 2.3** se muestra

una imagen de moléculas de DNA, de igual longitud en términos de nucleótidos, adsorbidas a la mica utilizando magnesio (moléculas equilibradas) y polilisina (moléculas cinéticamente atrapadas).



**Figura 2.3. Imágenes de AFM de moléculas de DNA (pGEM, 2743 bp).** a) Moléculas equilibradas (adsorbidas con magnesio incluido en la reacción) y b) moléculas cinéticamente atrapadas (pretratamiento de la mica con polilisina). La concentración de DNA es la misma en ambos experimentos (1 nM).

Existen numerosos trabajos donde se detallan diferentes métodos de adsorción de las moléculas de DNA a la mica u otras superficies (ver Capítulo 1, Sección 9.1). Sin embargo, no todos los protocolos para adsorber DNA permiten equilibrar las moléculas en la superficie.

## 1.2. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos

Aunque las propiedades mecánicas de los ácidos nucleicos varíen localmente debido a la secuencia, temperatura, forma, presencia de iones u otros componentes (Hansma, 1997), su comportamiento ha sido caracterizado con éxito en el rango de las kilo pares de bases (Smith, 1992) (Gross, 2011). Sin embargo, existen publicaciones recientes en las que muestran que a corta escala (< 150 bp) las moléculas de DNA son más flexibles de lo esperado (Wiggins, 2006) (Vafabakhsh, 2012). Este comportamiento a corta escala está directamente implicado en procesos biológicos como: interacciones con proteínas, formación de bucles, empaquetamiento en cápsidas víricas, interacción con histonas para formar estructuras más compactas en el núcleo, transcripción, regulación genética, etc. (Alberts, 2010).

Uno de los modelos más empleados para describir el comportamiento mecánico del DNA es el modelo del WLC (por sus siglas en inglés de *Worm-Like Chain*) que considera los ácidos nucleicos como una cadena polimérica rígida y electrostáticamente cargada, que puede doblarse ligeramente por fluctuaciones térmicas (Bustamante, 2003). El WLC considera que la energía de curvatura sigue un comportamiento armónico y se define como la energía

necesaria para doblar un segmento de DNA de longitud  $l$ , un cierto ángulo  $\theta$  (en radianes), a una energía térmica  $k_B T$ . La energía de curvatura para el WLC viene dada por la siguiente ecuación:

$$E_{WLC}(\theta) = \frac{k_B T P}{2l} \theta^2 \quad (2.1)$$

Este modelo utiliza la longitud de persistencia,  $P$ , como parámetro estadístico para caracterizar la flexibilidad de la cadena polimérica. La longitud de persistencia define la longitud media a la cual la dirección de la cadena persiste, o dicho de otra forma, la longitud media en la que las fluctuaciones térmicas curvan la molécula. La longitud de persistencia del DNA ha sido medida en numerosas ocasiones definiendo un valor entre 50 – 54 nm (Wang, 1997) (Bustamante, 2000) (Wiggins, 2006). Este valor indica que la molécula es relativamente rígida y difícil de doblar a distancias inferiores a  $P$ , lo cual sorprende debido a los numerosos ejemplos en los que el DNA presenta curvaturas mayores: nucleosomas, lazos de represión, etc. (Alberts, 2010). Otros modelos empleados para describir las propiedades mecánicas de polímeros lineales son el FJC (por sus siglas en inglés *Freely Jointed Chain*) o el modelo simplificado de varilla elástica (Nelson, 2005).

Sin embargo, en la última década se han publicado nuevos datos que indican que las propiedades mecánicas del DNA a corta escala no son tal y como se predecía por los modelos sino que las moléculas son más flexibles de lo esperado. En el artículo de (Wiggins, 2006), estudiaron por primera vez el comportamiento a distancias cortas de moléculas de DNA a partir de imágenes de AFM. Sus resultados indican que la energía de curvatura experimental es menor de la que predice el modelo del WLC. Por otra parte, en el artículo del grupo de Taekjip Ha (Vafabakhsh, 2012) demuestran mediante fluorescencia que moléculas de DNA de 100 bp son capaces de doblarse sobre sí mismas formando pequeños anillos circulares. También el artículo (Yuan, 2008) observa una mayor flexibilidad a distancias cortas mediante la técnica de FRET y SAXS. Todos estos resultados indican que las moléculas de DNA se pueden curvar más de la longitud de persistencia, lo que tiene gran importancia en muchos procesos celulares.

En el artículo de (Wiggins, 2006) se propone un modelo llamado LSEC (por sus siglas en inglés, *linear sub-elastic chain*) en el que la energía elástica empírica dependía linealmente del valor absoluto del ángulo de curvatura  $\theta$ , de la temperatura  $T$  y de una constante empírica  $\alpha$  (Ec. (2.2), en lugar de tener una dependencia cuadrática con el ángulo como supone el WLC.

$$E_{LSEC} = \alpha |\theta| k_B T \quad (2.2)$$

Esta dependencia lineal ha sido cuestionada recientemente por Mazur et al. (Mazur, 2014), donde argumentan que dicho comportamiento lineal es únicamente válido para las longitudes consideradas en el artículo ( $l = 2.5$  nm).



Otros estudios computacionales indican que existen distintas contribuciones a las fluctuaciones del ángulo de curvatura: una estática, debido a la propia estructura de la molécula, y otra dinámica que engloba las fluctuaciones no intrínsecas de la molécula (Noy, 2012).

Sin embargo, las propiedades mecánicas a corta escala de las moléculas de RNA no han sido estudiadas hasta la fecha.

### 1.2.1. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos con AFM

A partir de las imágenes de AFM es posible obtener información de las propiedades mecánicas de las moléculas de DNA. Para ello, un requisito imprescindible es que las moléculas estén equilibradas en la superficie.

La cadena polimérica se puede describir como una sucesión de puntos separados por una distancia,  $l$ , (ver Sección 2.4) y para una longitud de contorno  $L = nl$ , está estadísticamente definida por dos parámetros: la media del valor medio del cuadrado de la distancia extremo a extremo ( $R$ ) de la cadena polimérica,  $\langle R^2 \rangle$ , y la media del ángulo de curvatura ( $\theta$ ) entre dos tangentes consecutivas de la cadena polimérica,  $\langle \cos(\theta) \rangle$  (Hagerman, 1988). En la **Figura 2.5** se muestra una representación gráfica los parámetros  $L$ ,  $R$  y  $\theta$ .

Esta aproximación es posible debido a que cuando las moléculas están equilibradas en la mica, la distancia media  $\langle R \rangle = 0$  (Brinkers, 2009). Las expresiones para las distancias cuadráticas medias en 2D y 3D han sido resueltas analíticamente y son idénticas (**Ec. 2.3 y 2.4**) (Rivetti, 1996). En cambio, hay que tener en cuenta que la longitud de persistencia en 2D es el doble que en 3D (ver **Ecuación 2.5**).

$$\langle R^2 \rangle_{3D} = 2P_{3D}L - 2P_{3D}^2(1 - e^{-L/P_{3D}}) \quad (2.3)$$

$$\langle R^2 \rangle_{2D} = 2P_{2D}L - 2P_{2D}^2(1 - e^{-L/P_{2D}}) \quad (2.4)$$

$$P_{2D} = 2P_{3D} \quad (2.5)$$

Por lo tanto, en el caso de calcular la longitud de persistencia a partir de las imágenes de AFM debemos tener en cuenta la relación entre longitudes de persistencia en 2D y 3D, y las ecuaciones quedarían como se muestra a continuación (**Ec. 2.6 y 2.7**):

$$\langle R^2_{s,s+L} \rangle_{2D} = 4PL \left( 1 + \frac{2P}{L} (e^{-L/2P} - 1) \right) \quad (2.6)$$

$$\langle \cos(\theta)_{s,s+L} \rangle_{2D} = e^{-L/2P} \quad (2.7)$$

Estos dos parámetros son un indicador de que las moléculas están equilibradas en la superficie, puesto que en el caso de que las moléculas estén cinéticamente atrapadas la distancia cuadrática media de la proyección en el plano

XY de las configuraciones energéticamente más estables en 3D sigue la **Ec. 2.8**:

$$\langle R^2 \rangle_{3D \text{ proj}} = \frac{1}{3} \langle R^2 \rangle_{2D} \quad (2.8)$$

A partir de la trayectoria de las moléculas también se puede obtener la **energía de curvatura**. Ya que partimos de configuraciones equilibradas de moléculas, la distribución de ángulos entre las tangentes de los puntos separados una longitud  $L$  ( $L = nl$ ) viene dada por una distribución de Boltzmann (**Ec. 2.9**), donde  $q$  es el factor de normalización y  $E(\theta)$  es la energía de curvatura.

$$N(\theta(l)) = \frac{1}{q} e^{-E(\theta)/k_B T} \quad (2.9)$$

Por lo tanto, la energía de curvatura en unidades de  $k_B T$ , viene dada por la siguiente expresión (**Ec. 2.10**):

$$E(\theta) = -k_B T \ln \frac{N(\theta)}{\sum N(\theta)} \quad (2.10)$$

donde el factor de normalización en nuestro caso es el sumatorio de todos los ángulos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Purificación de las moléculas de DNA y RNA

Las moléculas de DNA y de RNA fueron preparadas por el Dr. Elías Herrero según el protocolo descrito en (Herrero-Galán, 2012). A partir de la molécula de  $\lambda$ -DNA, se seleccionó un fragmento de 4 kbp de longitud entre las posiciones 30286 y 34286, que tenía un contenido de GCs  $\sim 50\%$ .

Las moléculas de DNA se obtuvieron por digestión con dos enzimas de restricción, KpnI y SacI, cuya secuencia de corte fue introducida por mutagénesis a cada uno de los extremos del fragmento seleccionado. Posteriormente se amplificó el fragmento por PCR.

Las moléculas de RNA fueron generadas por hibridación de las dos hebras complementarias fabricadas independientemente. Empleando como plantilla la molécula de DNA anterior, se hicieron dos PCRs para amplificar el fragmento seleccionado de 4 kbp, pero incluyendo la secuencia promotora de la T7 RNA polimerasa en cada una de las hebras independientemente. Una vez se obtiene el producto PCR se transcribe cada hebra en experimentos independientes para obtener dos hebras complementarias de RNA. Posteriormente se hibridan las dos hebras en presencia de EDTA para obtener moléculas de RNA de cadena doble.

### 2.2. Preparación de las muestras para AFM

La reacción se preparó en un volumen final de 10  $\mu$ l con una concentración final de 0.25 nM de DNA o RNA en el tampón 25 mM Tris OAc (pH 7.5), 2.5 mM de acetato de magnesio y 2.5 mM de cloruro de níquel. La muestra se depositó durante 30-60 segundos en la mica previamente exfoliada y posteriormente se lavó con 3 ml de agua filtrada MilliQ y se secó con un chorro de nitrógeno gas.

La adsorción de las moléculas de DNA con magnesio se realizó siguiendo el mismo protocolo, a excepción del cloruro de níquel que fue sustituido por 10 mM de cloruro de magnesio.

### 2.3. Condiciones de medida con el AFM

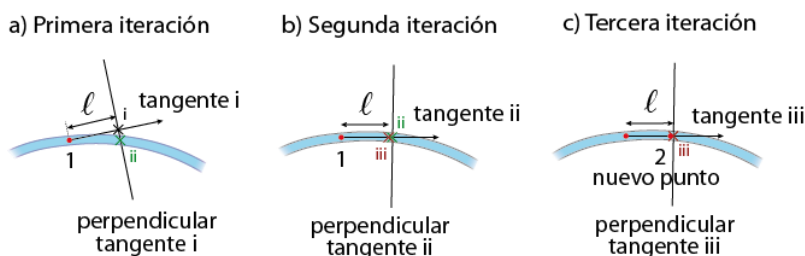
Las imágenes se tomaron con el AFM de Nanotec (Nanotec Electrónica, Madrid, España) descrito en la Sección 8 del Capítulo 1. El modo de medida utilizado fue el modo dinámico con modulación en amplitud (*tapping*) con una amplitud pico-pico de 5 nm para evitar dañar la muestra. La frecuencia de barrido utilizada fue de 1-2 líneas/s para imágenes de 750 x 750 nm<sup>2</sup> con

512 puntos (1.465 nm/píxel). Las imágenes se tomaron en aire y a temperatura ambiente, en condiciones de humedad ambiente (< 30%).

Las puntas utilizadas fueron el modelo PPP-NCH (PointProbePlus) de la empresa Nanosensors (Suiza). Ver **Tabla 1.1** para más detalle.

## 2.4. Obtención de trazas a partir de las imágenes de AFM

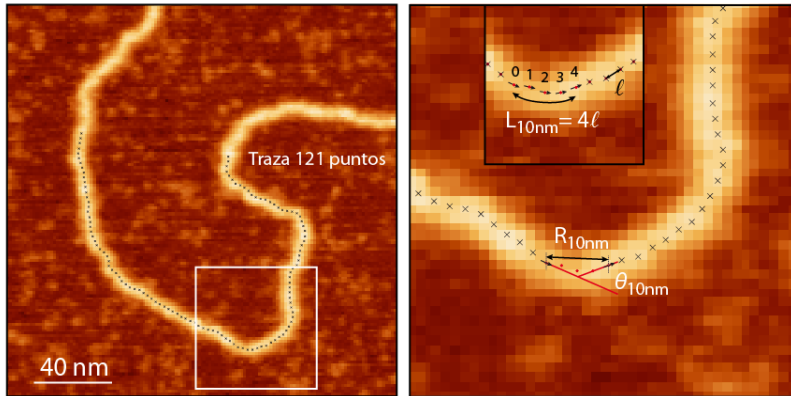
A partir de imágenes de AFM de alta resolución se puede obtener la trayectoria de las moléculas como una sucesión de puntos, lo que llamaremos traza. El programa que se ha utilizado para obtener las trazas fue desarrollado previamente en el grupo, siguiendo el algoritmo descrito en el artículo de (Wiggins, 2006).



**Figura 2.4. Algoritmo de obtención de trazas.** a) En la primera iteración se toma la tangente al primer punto (*i*) y a la distancia *l* se traza una perpendicular a la tangente de 10 nm de longitud. Entonces se analiza el centro de masas en dicha línea y se selecciona el nuevo punto de prueba (*ii*). b y c) Esta misma acción se repite durante tres iteraciones y al final el punto obtenido será añadido a la traza como punto 2.

El algoritmo consiste en lo siguiente (ver **Figura 2.4**): a partir de un punto inicial (punto 1) y de una dirección tangente (tangente *i*) que decide el usuario se comienza a iterar. En la primera iteración se traza una perpendicular a la tangente a una distancia *l* (punto *i*) y se obtiene el centro de masas en dicha línea perpendicular. El centro de masas será ahora el nuevo punto *ii* desde el que se repite la misma operación. Se traza una línea recta entre el punto 1 y el *ii*, separados una distancia *l*, se obtiene la perpendicular y se vuelve a buscar el centro de masas. Este ciclo se repite durante tres iteraciones y el nuevo punto (punto 2) se define a la distancia *l* desde el punto 1 en la dirección de la última tangente (tangente *iii*).

De esta forma, se van completando los puntos a lo largo de la trayectoria de la molécula. En nuestro caso, tomamos trazas de 300 nm de longitud con una distancia entre puntos, distancia *l*, de 2.5 nm (121 puntos en total). Un ejemplo de una traza se muestra en la **Figura 2.5**, junto con los parámetros *R*, *L* y  $\theta$  para cuatro pasos ( $L = n \cdot l = 10$  nm).



**Figura 2.5. Ilustración de una traza en una molécula de DNA.** Las trazas tiene una longitud de 300 nm (121 puntos) con una separación entre puntos de 2.5 nm. En la imagen ampliada se indican los parámetros  $R$ ,  $L$  y  $\theta$  para un  $n = 4$  ( $L = nl = 10$  nm).

### 3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue caracterizar las propiedades mecánicas de moléculas RNA de cadena doble por microscopía de fuerzas atómicas.

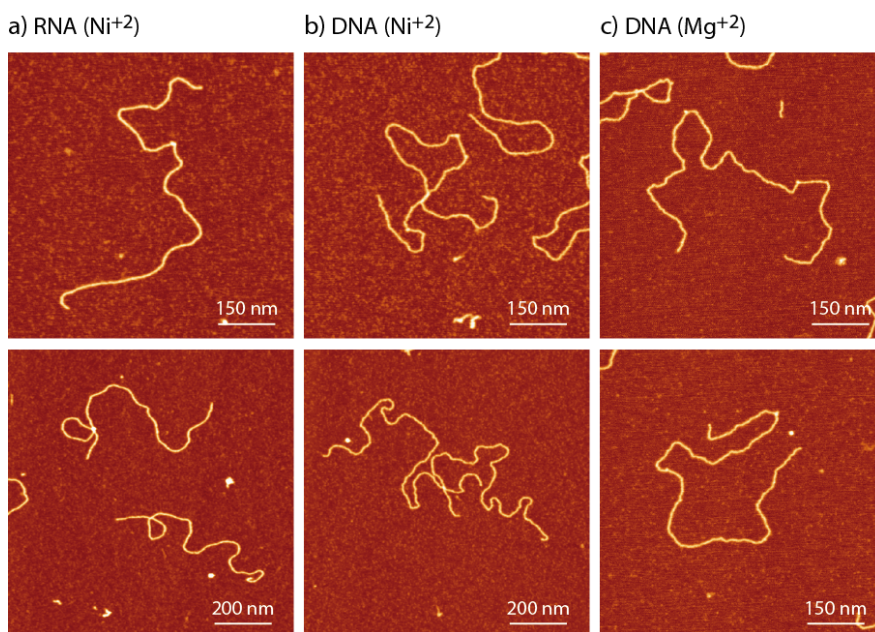
Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Adsorber y equilibrar las moléculas de RNA en la mica. Comparar directamente la altura y anchura con moléculas de DNA con la misma secuencia coadsorbidas en la misma superficie.
2. Medir las propiedades mecánicas de las moléculas de RNA y compararlas con las propiedades mecánicas de las moléculas de DNA.
3. Estudiar las propiedades mecánicas de las moléculas de RNA a corta escala a partir de imágenes de AFM de alta resolución y compararlas con las propiedades mecánicas a corta escala de moléculas de DNA con la misma secuencia.

## 4. Resultados experimentales

### 4.1. Adsorción de las moléculas de DNA y RNA a la mica

El método de adsorción empleando iones de magnesio, ampliamente utilizado para adsorber moléculas de DNA en mica, no permitió adsorber las moléculas de RNA. Por lo tanto, se exploraron otros métodos de adsorción que permitieran adsorber las moléculas de RNA en la mica. El pretratamiento de la mica con polilisina resultó favorable para adsorber moléculas de RNA, sin embargo, éstas se quedaban atrapadas cinéticamente en la mica de manera que no era posible medir sus propiedades mecánicas. Otros métodos como el empleo de espermidina ( $\text{spd}^{+3}$ ) o iones divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mn}^{+2}$ , no dieron mejores resultados. En el caso de la espermidina las moléculas se adsorbían a la superficie pero se quedaban cinéticamente atrapadas como ocurre con la polilisina, mientras que con iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  no se adsorbían eficientemente a la mica.



**Figura 2.6. Moléculas de DNA y RNA adsorbidas con magnesio y níquel a la mica.** **a)** Moléculas de DNA adsorbidas con magnesio. **b)** Imágenes de DNA adsorbidas con níquel. **c)** Moléculas de RNA adsorbidas con níquel. Escala de color (de oscuro a brillante) de 0 – 2.2 nm.

El empleo de iones de níquel ha sido empleado anteriormente para adsorber moléculas de DNA (Hansma, 1996). Dado que este ión divalente tiene una entalpía de hidratación mayor que el magnesio, favorece una adsorción más

fuerte a la mica (Hansma, 1996). La adsorción de las moléculas de RNA a la mica utilizando níquel resultó posible y comprobamos que una concentración nanomolar (2-3 nM) era suficiente para adsorber las moléculas a la superficie pero estando suficientemente libres para adoptar una configuración equilibrada. Estas concentraciones de  $\text{Ni}^{+2}$  contrastan con concentraciones típicas de  $\text{Mg}^{+2}$  del orden de 10-15 mM empleadas para adsorber moléculas de DNA.

En la **Figura 2.6** se muestran imágenes de moléculas de RNA adsorbidas con níquel junto con imágenes de moléculas de DNA adsorbidas con magnesio y níquel, que emplearemos como control. A partir de las imágenes de RNA y DNA determinamos longitudes de contorno medias de  $1.16 \pm 0.05 \mu\text{m}$  y de  $1.40 \pm 0.04 \mu\text{m}$ , respectivamente (ver **Figura 2.7 (b)**). Nótese que a pesar de poseer ambas el mismo número de nucleótidos y secuencias idénticas (a excepción de uracilo por timina en el RNA) las longitudes de contorno son distintas. Esta diferencia es debida a la estructura secundaria que adopta cada molécula. A pesar de que las dos moléculas tienen la misma secuencia, las moléculas de RNA adoptan la forma A de manera estable, mientras que las moléculas de DNA adoptan la forma B. De estas medidas se obtiene que la relación de pares de bases por nm es de 0.35 nm/bp para el DNA y de 0.29 nm/bp para el RNA, valores que están de acuerdo con lo publicado (Saenger, 1984).

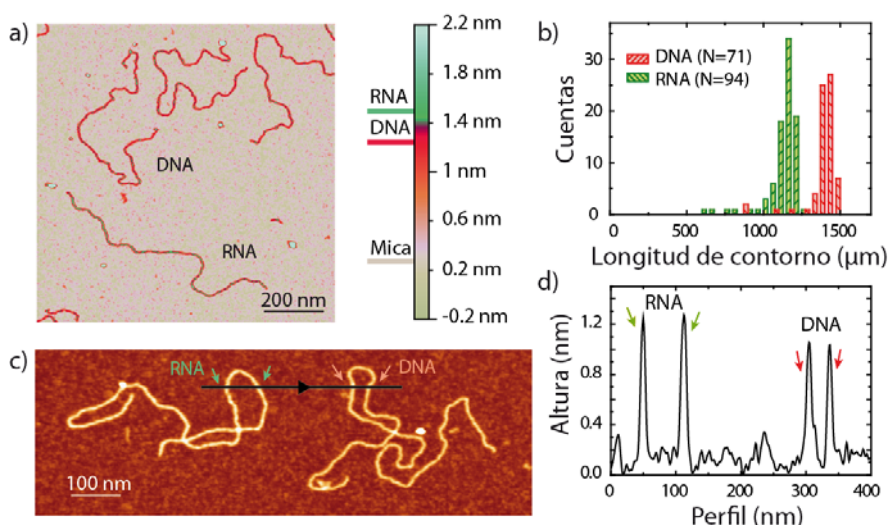
#### 4.2. Co-adsorción de las moléculas de DNA y RNA

A pesar de que el AFM es una técnica que permite medir alturas con gran precisión, comparar las alturas en diferentes experimentos puede llevar a error. Por ejemplo, cuando se trabaja en aire, la muestra se va deshidratando y como consecuencia la altura puede variar a lo largo del experimento. Por lo tanto, la comparación de imágenes entre diferentes experimentos debe de hacerse con cuidado. Para comparar directamente moléculas de DNA y RNA adsorbidas con mismas condiciones experimentales, se decidió co-adsorber ambas moléculas en la misma superficie (**Figura 2.7 (a y c)**).

Mediante una simple inspección visual de las imágenes se puede distinguir ambas moléculas, siendo las moléculas de RNA más brillantes (más altas) en la escala de color y las moléculas de DNA más oscuras (más bajas). Además, cuantitativamente se puede comparar la altura de ambas moléculas dentro de una misma imagen, obteniendo una altura media para las moléculas de DNA de  $1.00 \pm 0.06 \text{ nm}$  y de  $1.20 \pm 0.06 \text{ nm}$  para las molécula de RNA. Un perfil de alturas representativo se muestra en la **Figura 2.7 (d)**.

Estos datos son consistentes con la estructura adoptada por cada molécula, siendo las moléculas de DNA más alargadas y delgadas, y las moléculas de RNA más cortas y gruesas.





**Figura 2.7. Coadsorción de moléculas de DNA y RNA en la mica con níquel. a)** Imagen de AFM donde se observan coadsorbidas tres moléculas de DNA (parte superior de la imagen) y una molécula de RNA (parte inferior). La escala de color se indica a la derecha de la imagen. **b)** Longitud de contorno de las moléculas de DNA y RNA. **c)** Imagen de AFM de una molécula de RNA (izquierda) coadsorbida con una molécula de DNA (derecha). Escala de color (de oscuro a brillante) de 0 – 2.2 nm. **d)** Perfil de alturas indicado en la imagen de AFM con una barra negra.

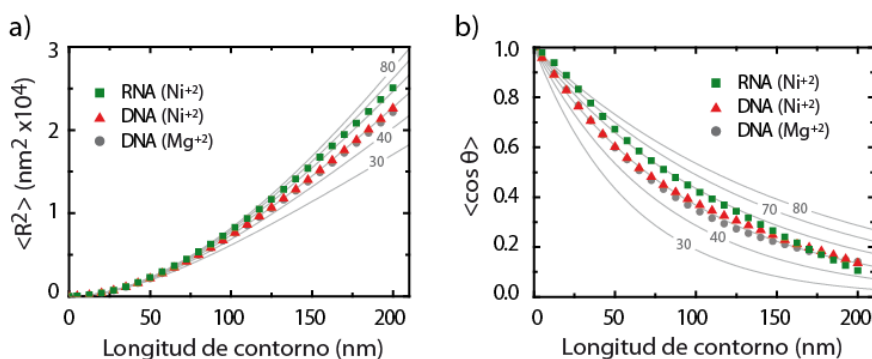
### 4.3. Propiedades mecánicas de ácidos nucleicos

A partir de las imágenes de AFM es posible medir las propiedades mecánicas de ácidos nucleicos analizando la trayectoria de las moléculas como se ha descrito anteriormente en la Sección 2.4. Para ello, es imprescindible que las moléculas estén equilibradas en la mica. Una primera comprobación de que las moléculas están equilibradas en la mica es probar que la distancia cuadrática media,  $\langle R^2 \rangle$  siga la **Ecuación 2.6** descrita por (Rivetti, 1996). En la **Figura 2.8 (a)** se muestra la distancia cuadrática media en función de la longitud de contorno y se observa que los datos obtenidos en los tres experimentos (RNA- $\text{Ni}^{+2}$ , DNA- $\text{Ni}^{+2}$  y DNA- $\text{Mg}^{+2}$ ) se ajustan a la misma función, cambiando el parámetro de la longitud de persistencia. En el caso de las moléculas de RNA, el mejor ajuste se hizo con una longitud de persistencia de 62 nm y en el caso del DNA el mejor ajuste se hizo con una longitud de persistencia de 47.5 nm para las moléculas adsorbidas con  $\text{Mg}^{+2}$  y de 49 nm con  $\text{Ni}^{+2}$ .

Como un segundo criterio para comprobar que las moléculas están equilibradas en la mica se utilizó la correlación entre tangentes,  $\langle \cos(\theta) \rangle$ , cuya dependencia con la longitud de contorno debe seguir la **Ec. 2.7**. Este criterio que analiza los ángulos entre las tangentes es más restrictivo que el de la distancia cuadrática media, puesto que es más sensible a pequeños errores en la colocación de puntos en las trazas (Wiggins, 2006). De hecho, se observa que

para distancias mayores de 150 nm los datos experimentales se desvían ligeramente de la función teórica. Esto es debido a que para esas distancias el número de ángulos analizados es menor y la correlación se reduce. Una posible solución para obtener una mayor estadística sería tomar trazas de mayor longitud o aumentar el número de trazas.

Estos dos criterios reflejan que al menos en el rango de los 200 nm las moléculas están equilibradas en la superficie. Además, la longitud de persistencia obtenida está de acuerdo con lo publicado anteriormente (Smith, 1996) (Wang, 1997) (Abels, 2005). De lo contrario, si las moléculas estuvieran cinéticamente atrapadas en la superficie, la longitud de persistencia seguiría la **Ecuación 2.8** descrita por (Rivetti, 1996).



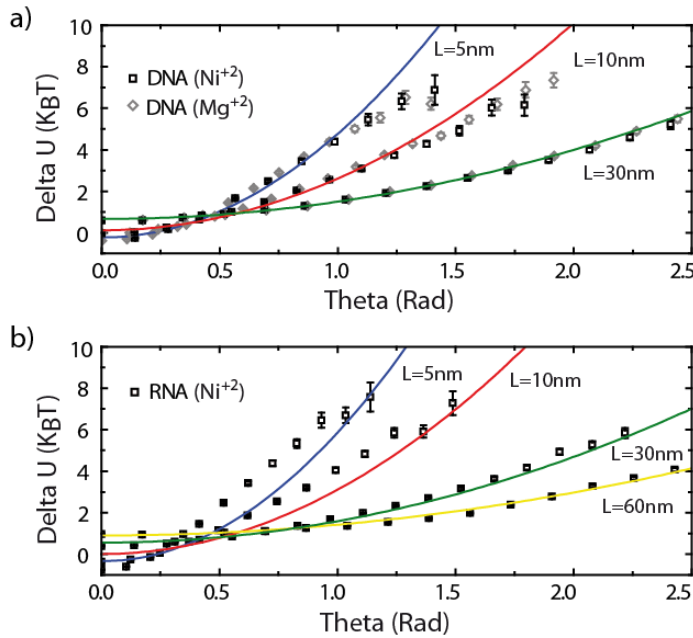
**Figura 2.8. Propiedades mecánicas del DNA y RNA.** a) Representación de la distancia cuadrática media, y b) del ángulo de curvatura medio, frente a la longitud de contorno. A partir de los ajustes a las Ecuaciones 2.6 y 2.7 se obtiene la longitud de persistencia para cada experimento.

#### 4.4. Propiedades mecánicas a corta escala

Siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 1.2.1 se ha analizado la energía de curvatura a partir de la distribución de ángulos entre las tangentes de los puntos separados una longitud  $L$  (Figura 2.9).

En el caso de las moléculas de DNA se observa que a distancias cortas, la energía de curvatura que se necesita para doblar una molécula un cierto ángulo es menor de lo que predice el modelo del WLC. Estos resultados fueron previamente publicados por (Wiggins, 2006) donde empleaban magnesio como método de adsorción. Nuestros datos reproducen sus resultados, adsorbiendo las moléculas de DNA con magnesio (rombos grises) y comprobamos que las moléculas adsorbidas con níquel (cuadrados negros) tienen el mismo comportamiento. La energía de curvatura a longitudes pequeñas ( $L = 5 \text{ nm}$ ) es menor de la esperada y a medida que aumenta la longitud de contorno  $L$ , los valores experimentales se van ajustando mejor a los valores teóricos predichos por el WLC, hasta llegar a una  $L = 30 \text{ nm}$ , donde ambos valores coinciden perfectamente.

Las moléculas de RNA, por el contrario, tienen una energía de curvatura superior a la predicha por el modelo del WLC a distancias cortas. Esto significa que a distancias cortas ( $L = 5 \text{ nm}$ ), se requiere de mayor energía de curvatura para doblar la molécula, es decir, el RNA se comporta como una molécula más rígida con una longitud de persistencia equivalente de 115 nm. Según aumenta la longitud de contorno, los datos experimentales se van aproximando a los datos teóricos predichos por el WLC como ocurre con el DNA. Sin embargo, en este caso, se necesita llegar hasta longitudes similares a la longitud de persistencia ( $L = 60 \text{ nm}$ ) para que los datos experimentales sigan el comportamiento del WLC.



**Figura 2.9. Propiedades mecánicas del DNA y RNA a distancias cortas. a)** Distribución de probabilidad de las moléculas de DNA adsorbidas con níquel (cuadrados negros) y magnesio (rombos grises). **b)** Distribución de probabilidad de las moléculas de RNA adsorbidas con níquel (cuadrados negros).

Los datos de la **Figura 2.9** han sido filtrados para un umbral de energías de curvatura superiores del 15% de la energía límite. Esto es debido a que para calcular la energía de curvatura (**Ec. 2.10**) se divide el histograma  $N(\theta)$  entre el sumatorio de todos los ángulos y esto conduce a un valor límite, que hemos denominado energía límite,  $E_L$ . La energía límite depende por tanto del número de ángulos normalizados y tiende a un valor en torno a los 8 – 9  $k_B T$ . En la **Tabla 2.2** se muestran el valor de la energía límite y el número de ángulos analizados para cada experimento a diferentes longitudes de contorno.

Los datos obtenidos por encima de esa energía límite, quedan reflejados en la **Tabla 2.2** como ángulos grandes ( $\theta \geq 1.1 \text{ rad}$ ) y ángulos medianos-grandes ( $\theta \geq 0.8 \text{ rad}$ ). Se observa que para longitudes pequeñas ( $L = 5 \text{ nm}$ ) el número de ángulos grandes para el DNA es entre 6 y 7 veces más grande que para el RNA. Esto quiere decir que a corta escala el RNA es considerablemente más rígido que el DNA. Lo mismo ocurre para ángulos medianos-grandes. Sin embargo, según vamos aumentando la longitud de contorno la proporción se va reduciendo hasta un factor 2, con  $L = 30 \text{ nm}$ .

**Tabla 2.2. Resumen de los datos analizados para diferentes longitudes de contorno ( $L = 5, 10$  y  $30 \text{ nm}$ ).** En la primera fila se indica el número de ángulos analizados. En la segunda fila la energía límite,  $E_L$ , en unidades de  $k_B T$ . En la tercera y cuarta fila se muestra el número de ángulos grandes ( $\theta \geq 1.1 \text{ rad}$ ) y medianos-grandes ( $\theta \geq 0.8 \text{ rad}$ ) junto con su porcentaje correspondiente.

	L = 5 nm			L = 10 nm			L = 30 nm		
	DNA Mg <sup>+2</sup>	DNA Ni <sup>+2</sup>	RNA Ni <sup>+2</sup>	DNA Mg <sup>+2</sup>	DNA Ni <sup>+2</sup>	RNA Ni <sup>+2</sup>	DNA Mg <sup>+2</sup>	DNA Ni <sup>+2</sup>	RNA Ni <sup>+2</sup>
No. $\theta$	55085	26565	47495	54127	26103	46669	50295	24255	43365
$E_L$ (kBT)	8.655	8.201	8.471	8.747	8.159	8.634	9.049	8.308	8.672
No. $\theta \geq 1.1 \text{ rad}$	54	19	9	449	238	64	3684	1862	1974
Frac. (%)	0.098	0.072	0.013	0.83	0.91	0.14	7.3	7.7	4.6
No. $\theta \geq 0.8 \text{ rad}$	338	172	38	1686	921	415	7219	3578	4548
Frac. (%)	0.61	0.65	0.08	3.1	3.5	0.89	14.4	14.8	10.5

Como conclusión, las propiedades mecánicas del RNA a escalas pequeñas (pocos nm) presentan una desviación con respecto a las predichas por el WLC hacia una mayor rigidez que puede cuantificarse como el doble de su longitud de persistencia a grandes escalas (decenas de nm).

## 5. Discusión de los resultados

Las propiedades mecánicas de los ácidos nucleicos son muy importantes para entender cómo funcionan ciertos procesos biológicos. Dado que la mayor parte de las reacciones en la célula ocurren en el rango del nanómetro, las propiedades mecánicas de los ácidos nucleicos a corta escala tienen todavía más importancia. Por ejemplo, el DNA de una célula humana tiene alrededor de 2 metros de longitud. Sin embargo, la molécula de DNA está bien compactada en el núcleo que tiene un tamaño de pocas micras. Para conseguir esta alta compactación las moléculas de DNA se enrollan en unas proteínas llamadas histonas que tienen un radio de decenas de nanómetros (Alberts, 2010).

Desde la publicación del artículo de (Wiggins, 2006), las propiedades a corta escala de las moléculas de DNA han sido cuestionadas. La conclusión de su trabajo indicó que las moléculas de DNA a distancias cortas tenían una longitud de persistencia menor de lo predicho por modelos estadísticos como el WLC. Es decir, las moléculas de DNA eran más flexibles de lo esperado. A esta misma conclusión han llegado distintos grupos de investigación empleando otras técnicas como SAXS (Yuan, 2008) y FRET (Vafabakhsh, 2012). Estos resultados refuerzan los resultados obtenidos por (Wiggins, 2006), validando la técnica del AFM para medir propiedades mecánicas a distancias cortas al contrario de lo que sugiere el artículo de (Mazur, 2014).

En esta tesis se ha utilizado la microscopía de fuerzas atómicas para medir propiedades mecánicas de cadenas poliméricas como son las moléculas de RNA. Para ello, fue necesario desarrollar un método para adsorber y equilibrar las moléculas en la mica. Esto se consiguió introduciendo una concentración nanomolar de iones de níquel en la reacción. Este método se empleó con moléculas de DNA, produciendo resultados equivalentes a los obtenidos por el método tradicional de adsorción de magnesio y se extendió a las moléculas de RNA dando buenos resultados. La co-adsorción permitió distinguir inequívocamente mediante simple inspección visual las moléculas de DNA de las de RNA, además de cuantificar su longitud de contorno y altura.

A pesar de que se ha descrito que el magnesio reduce la longitud de persistencia de las moléculas de DNA (Baumann, 1997), nosotros hemos comprobado que su comportamiento es el mismo que con otros iones divalentes como el níquel.

La longitud de persistencia del DNA empleando magnesio como método de adsorción ya se había obtenido por microscopía de fuerzas atómicas anteriormente. Nuestros experimentos reproducen estos resultados y además, introducimos un nuevo método basado en iones de níquel para equilibrar las moléculas en la mica. Los iones de níquel tienen un radio iónico más grande que los iones de magnesio y han permitido equilibrar

también las moléculas de RNA en la mica con las mismas condiciones. Dado que las moléculas de RNA siguen los mismos criterios de  $\langle R^2 \rangle$  y  $\langle \cos(\theta) \rangle$  establecidos por (Rivetti, 1996), podemos asegurar que en las longitudes medidas de al menos 200 nm, las moléculas están equilibradas en la superficie.

En el caso del **DNA** las energías de curvatura experimentales se desvían hacia valores más pequeños a escalas cortas. Esto quiere decir que las moléculas de DNA son más flexibles que lo medido y predicho por el modelo del WLC a escalas grandes. Según aumenta la longitud de contorno, los datos experimentales se van aproximando más a los teóricos, hasta llegar a una longitud de contorno de 30 nm, donde coinciden. En el caso del **RNA**, la energía de curvatura experimental se desvía hacia valores más grandes, al contrario de lo que ocurre con el DNA. Este comportamiento corresponde con una molécula con una longitud de persistencia mayor que lo medido a escalas grandes, es decir, una molécula más rígida. Según aumenta la longitud de contorno, los datos experimentales se van aproximando más a los teóricos, pero en este caso no coinciden hasta alcanzar un valor cercano a su longitud de persistencia  $L = 60$  nm.

Dado que los resultados obtenidos para las moléculas de DNA y RNA siguen comportamientos opuestos (el DNA es más flexible mientras que el RNA es más rígido a corta escala), descarta la posibilidad de que exista un error intrínseco en las medidas. Estos resultados por tanto, justifican el empleo del AFM para medir propiedades de ácidos nucleicos u estructuras unidimensionales a corta escala.

La elección de moléculas de DNA en lugar de RNA para el almacenamiento del material genético de manera eficiente ha sido motivo de reflexión durante muchos años. A pesar de que ambas son moléculas bicatenarias formadas por la agrupación en pares de cuatro bases nitrogenadas, la estructura que adopta cada una de ellas (forma A y forma B) ha conducido a tener unas propiedades mecánicas a corta escala diferentes. Uno de los éxitos evolutivos en sistemas eucariotas es la habilidad que tienen las moléculas de DNA para agruparse en estructuras mayores formando cromosomas. Este empaquetamiento tan elevado de las moléculas no se podría haber desarrollado para las moléculas de RNA, impidiendo que éstas fueran las elegidas para almacenar y compactar el material genético de manera eficiente en el núcleo celular.

# 3. Medidas de Volumen de Proteínas y Ácidos Nucleicos

## 1. Introducción

A partir de las imágenes topográficas obtenidas con el AFM es posible calcular el volumen de objetos nanométricos. El AFM proporciona una medida de la altura con una precisión de angstroms, pero sin embargo, la anchura del objeto está afectada por las dimensiones de la punta, lo que se conoce como dilación. Por lo tanto, la medida del volumen está directamente relacionada con el tamaño de la punta, de manera que, una punta más gruesa producirá una dilación mayor que una punta más fina.

En este capítulo vamos a detallar los distintos métodos descritos en la literatura para calcular el volumen de objetos a partir de imágenes de AFM. Además, presentaremos una nueva aproximación para calcular el volumen de proteínas y ácidos nucleicos que reduce el error de la medida y comentaremos las posibles consideraciones que hay que tener en cuenta a la hora de aplicar los métodos de cálculo de volúmenes, como son el tamaño de la punta o la elección de un objeto de referencia.

### 1.1. Medidas de volumen

Las medidas de volumen a partir de imágenes de AFM se han utilizado en aplicaciones biológicas para determinar la estequiometría de proteínas (Schneider, 1998), la constante de asociación entre proteínas (Ratcliff, 2001), la interacción entre proteínas (Schlacher, 2005) o entre proteína y DNA (Wyman, 1997).

Los métodos descritos en la literatura para calcular el volumen de proteínas a partir de imágenes de AFM se pueden dividir en dos clases: los métodos geométricos y los métodos directos. En la **Tabla 3.1** se describen las principales ventajas e inconvenientes de usar cada método.

Tabla 3.1. Métodos para obtener volumen de objetos a partir de imágenes de AFM.

Métodos	Fundamentos	Ventajas /Inconvenientes del método
Geométricos	i) Medida de las dimensiones a partir de perfiles de alturas	+ Fácil de medir + No es necesario sustraer el ruido de fondo + Minimiza los efectos de la convolución – Se debe asumir la forma del objeto para emplear el modelo geométrico que más se aproxime
	ii) Empleo de métodos geométricos	– Únicamente válido para objetos globulares
Directos	i) Medida del volumen directamente a partir de las imágenes de AFM	+ No es necesario asumir la forma del objeto + Puede aplicarse a moléculas de cualquier forma (globulares y no globulares) – Mayor contribución de la dilación
	ii) Empleo de métodos para reducir el ruido de fondo	– Se debe sustraer el ruido de fondo

Los **métodos geométricos** se basan en utilizar el modelo geométrico que más se aproxime al objeto a estudiar (casquete polar, elipsoide, ovoide, etc.) e implementarlo a partir de medidas experimentales de la anchura y la altura. Se han descrito distintas aproximaciones aplicadas a proteína globulares que comentaremos a continuación (ver **Figura 3.1** para más detalle).

- a) La aproximación más sencilla se basa en considerar la proteína globular como un **segmento de una esfera** (**Figura 3.1 (a)**). A partir de perfiles experimentales se mide el radio,  $r$ , y la altura,  $h$ , y se aplica la siguiente ecuación:

$$V = \frac{\pi h}{6} (3r^2 + h^2) \tag{3.1}$$

Algunos autores utilizan la medida del radio en el plano basal, como (Schneider, 1995), (Henderson, 1996), (Ellis, 1999) y (Li, 1999), y otros la medida del radio a media altura, (Schneider, 1998) y (Berge, 2000). En el artículo de (Neaves, 2009) comparan los volúmenes de proteínas tomando el radio basal y el radio a media altura con los volúmenes teóricos (calculados según la Ecuación 3.6). Ambos volúmenes experimentales son proporcionales al volumen teórico. Sin embargo, el volumen obtenido midiendo el radio a media altura es aproximadamente 3 veces menor al volumen teórico, mientras que el volumen obtenido midiendo el radio basal es muy similar al teórico (tan solo 1.2 veces más pequeño).



Esta aproximación también se ha empleado para caracterizar la interacción de proteínas y DNA. En el artículo de (Neaves, 2009) y (Berge, 2000) lo aplican a estudiar la interacción de EcoRI con el DNA. A pesar de que sus datos tienen un error relativo de aprox. 30%, es suficiente para distinguir entre la interacción como monómero o dímero de la proteína EcoRI con el DNA.

- b) La segunda aproximación se basa en considerar la proteína como un **esferoide ovalado** (Figura 3.1 (b)). En este caso se considera que el radio experimental coincide con el radio del esferoide y la ecuación queda como sigue:

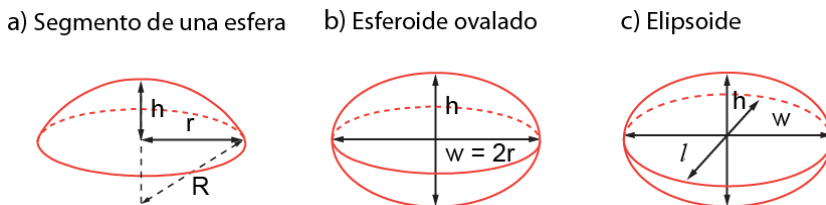
$$V = \frac{\pi}{6} h w^2 \quad (3.2)$$

donde  $w$  es el diámetro y  $h$  la altura experimental. Este método ha sido aplicado por (Minh, 2009) para caracterizar la interacción entre la proteína PepA y el DNA, midiendo la anchura a 0.5 nm del plano basal para corregir la contribución del DNA y de las imperfecciones de la superficie.

- c) La tercera aproximación considera la proteína como un **elipsoide** (Figura 3.1 (c)) y la ecuación que se aplica es la siguiente:

$$V = \frac{\pi}{6} h w l \quad (3.3)$$

donde  $w$  y  $l$  son los diámetros de cada eje y  $h$  es la altura experimental, tomados en el plano basal (Tang, 2007) y a media altura (Shlyakhtenko, 2007) y (Shlyakhtenko, 2011).



**Figura 3.1. Diferentes aproximaciones geométricas aplicadas al cálculo de volumen de proteínas globulares.** La proteína puede ser considerada como a) un segmento de una esfera, b) un esferoide ovalado y c) un elipsoide.

En algunos casos se emplean nanopartículas de oro como volumen fiducial (Neaves, 2009) o proteínas cuyo peso molecular es conocido (Shlyakhtenko, 2007). Sin embargo, ambas estrategias tienen desventajas. Por ejemplo, la adsorción de nanopartículas de oro en la mica requiere de una funcionalización previa de la superficie con *poly-L-lysina*, lo que cambia las condiciones de adsorción de la proteína de estudio. Por otra parte, la utilización de proteínas

como control tiene el inconveniente de que a veces no es posible distinguir entre las dos proteínas (proteína control y la proteína de estudio) o puede haber interacciones entre ambas.

Los **métodos directos** se basan en calcular el volumen absoluto del objeto considerando los píxeles que contribuyen a la imagen del objeto. En este caso también hay diferentes aproximaciones que se muestran en la **Figura 3.2**: a) calcular el área de una lámina a partir de un umbral de altura y multiplicarla por la altura media (Wyman, 1997) (Ratcliff, 2001) (Beerens, 2005) (van der Linden, 2009); b) calcular el volumen desde la altura a media altura hasta la parte superior del objeto y multiplicarlo por dos (Pietrasanta, 1999) y c) emplear DNA como molécula de referencia y substracción del volumen de fondo, que es el método que se ha desarrollado en esta tesis y que vamos a explicar con más detalle en la Sección 4.1 de resultados.

- a) La primera aproximación de los métodos directos se basa en **calcular el volumen multiplicando la altura media por el área de la proteína a partir de un umbral de altura** (ver **Ecuación 3.4**). Este método ha sido aplicado por (Wyman, 1997) (Ratcliff, 2001) y (Beerens, 2005).

$$V_p = A_p (h_p - H) \quad (3.4)$$

donde  $A_p$  es el área a partir de un umbral de altura,  $h_p$  es la altura media y  $H$  es la altura basal.

Algunos grupos emplean una proteína de peso molecular conocido, como la proteína Ku70/80 de 155 kDa, como volumen control (van der Linden, 2009).

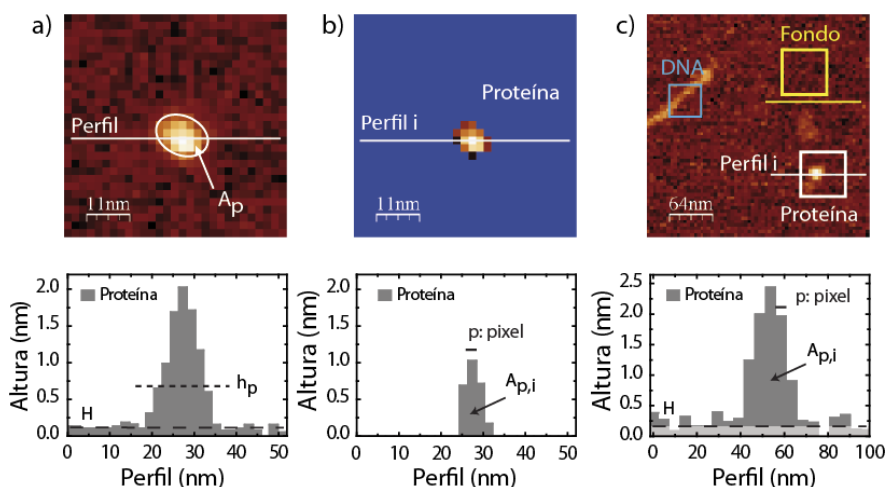
- b) La segunda aproximación mide el **volumen desde el plano a media altura hasta la parte superior de la proteína y dobla su valor** (**Ec. 3.5**).

$$V_p = 2 \sum_{i=1}^M A_{pi} \cdot p \quad (3.5)$$

donde  $A_p$  es el área a media altura y  $p$  es el tamaño del píxel. Este método ha sido empleado por (Pietrasanta, 1999) para caracterizar la interacción de CBF3 con el DNA. Además, compararon los resultados con el método geométrico que considera a la proteína como un segmento de una esfera y con el volumen teórico obteniendo resultados muy parecidos entre sí.

- c) La última aproximación es una **medida directa del volumen que introduce el DNA como molécula de volumen fiducial y que además incluye una corrección del volumen de fondo**. Esta aproximación se desarrolla con detalle en la Sección 4.1.

En la mayoría de estos trabajos, el error relativo del volumen medido es del 20% o mayor (Ratcliff, 2001) (Neish, 2002) (Minh, 2009), por lo que proteínas de un peso molecular parecido no podrían ser identificadas.



**Figura 3.2. Métodos directos para medir el volumen de proteínas globulares y no globulares.** a) Se mide el volumen multiplicando el área de la proteína por la altura media. b) Se mide el volumen a partir de un plano a media altura multiplicándolo por dos. c) Se mide el volumen directamente en un área de interés y posteriormente se le sustrae un volumen con origen el ruido de fondo de la imagen. Este método introduce moléculas de DNA, cuyo volumen se toma como referencia.

El **volumen teórico** de una proteína cuyo peso molecular es conocido se puede estimar utilizando la **Ecuación 3.6** (Cantor, 1980) (Edstrom, 1990).

$$V_h = \frac{MW}{N_A} (\bar{V}_2 + \delta \bar{V}_1) \quad (3.6)$$

donde MW es el peso molecular de la proteína,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $\bar{V}_2$  es el volumen parcial de la proteína ( $0.741 \text{ cm}^3 / \text{g}$ ),  $\bar{V}_1$  es el volumen específico parcial del agua ( $1 \text{ cm}^3 / \text{g}$ ) y  $\delta$  es el factor de hidratación de la proteína (sobre  $0.3 - 0.4 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g proteína}$ ). A partir de los volúmenes obtenidos con proteínas cuyo peso molecular es conocido, es posible compararlos con otros de proteínas desconocidas para obtener información de la estequiometría de una proteína o de un complejo de proteínas.

En esta tesis presentamos una nueva aproximación para medir volúmenes de proteínas y ácidos nucleicos, basada en los métodos directos previamente descritos en la literatura para medir el volumen. Esta aproximación se basa en calcular el volumen por encima de un umbral de altura e incorpora dos ideas adicionales que reducen el error relativo del volumen a la mitad: la introducción de moléculas de DNA como volumen fiducial y la sustracción del volumen de fondo calculando una densidad de ruido.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Condiciones de medida con el AFM

Las imágenes se tomaron con el AFM de Nanotec (Nanotec Electrónica, Madrid, España) descrito en la Sección 8 del Capítulo 1. El modo de medida utilizado es el modo dinámico con modulación en amplitud (*tapping*) con una amplitud pico-pico de 5 nm para evitar dañar la muestra. La frecuencia de barrido utilizada es de 1-2 líneas/s para un tamaño de imagen de 500 x 500 nm<sup>2</sup> con 512 puntos (0.98 nm/píxel). Las imágenes se tomaron en aire y a temperatura y humedad ambiente (22°C y 30%).

Las micropalancas estándar utilizadas fueron el modelo PPP-NCH (PointProbePlus) de Nanosensors (Suiza) y las puntas finas ACT-SS *ultrasharp* de Nanosensors (Suiza). Ver **Tabla 1.1** para más detalle.

### 2.2. Protocolo para obtener volúmenes

El procedimiento general para medir el volumen de objetos a partir de imágenes de AFM se detalla a continuación:

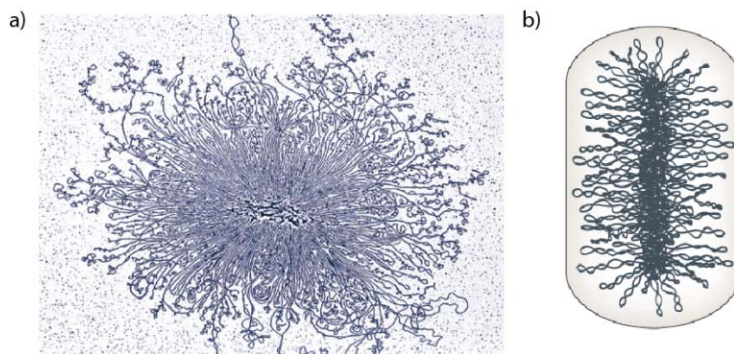
- 1) Obtener una imagen de alta calidad y con una resolución adecuada. Este paso es crucial para obtener una buena medida del volumen. Para ello, es importante considerar los siguientes apartados:
  - Tomar la imagen cuando el sistema esté en equilibrio térmico para evitar posibles artefactos o distorsiones en la imagen debido a la deriva térmica (*drift*).
  - Barrer varias veces la misma área hasta comprobar que el piezotubo no tiene histéresis o *creep*.
  - Ajustar el ángulo entre la superficie y el barrido de la punta. Esto aumentará el tiempo de vida de la punta y permitirá tomar más imágenes de buena calidad.
  - Ajustar la frecuencia de barrido y los parámetros del sistema de realimentación de manera que la imagen que se tome sea correcta.
  - Comprobar que no se producen artefactos en la imagen y que proporcionen una medida errónea del volumen.
- 2) Procesamiento de la imagen para el análisis. El procesamiento generalmente consiste en la substracción de un plano global y de un *flatten* lineal. Esto corrige posibles desviaciones en el plano de la imagen ajustándolo a una ecuación de segundo orden. Es importante eliminar las regiones donde haya proteína o ácidos nucleicos a la hora de realizar el procesamiento. El programa WSxM ha incorporado la herramienta *Flatten Plus* que descarta las regiones donde hay objetos mediante la técnica de inundación o *flooding*.

- 3) Medida del volumen de una proteína a partir de la imagen de AFM. Existen diversos programas que permiten calcular el volumen de objetos, como por ejemplo el ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), el Image SXM (<http://www.liv.ac.uk/~sdb/ImageSXM/>) y el WSxM (Horcas, 2007) que son programas gratuitos. También algunos programas comerciales específicos para AFM proporcionan esta aplicación (Nanoscope, etc.). En nuestro caso, hemos utilizado un programa desarrollado en Labview (basado en el método descrito en la Sección 4.1) que permite obtener volúmenes a partir de imágenes de AFM en formato ASCII, que se encuentra disponible para descargar en: (<http://www.cnb.csic.es/~volume-app>).

### 2.3. Proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas

Hemos estudiado el complejo procariota de proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas o complejo SMC (por sus siglas en inglés de *Structural Maintenance of Chromosomes*) de *Bacillus subtilis* mediante el método de cálculo de volúmenes.

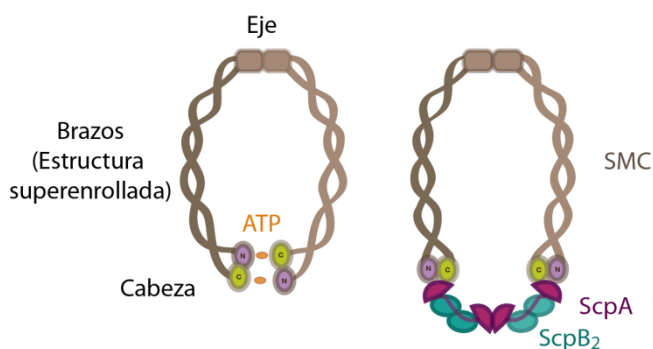
Las proteínas de la familia SMC están implicadas en procesos fundamentales de la división celular, como la organización y segregación de los cromosomas (Aragon, 2013). En eucariotas existen seis tipos diferentes de proteínas SMC que forman tres tipos de complejos: las **cohesinas** (SMC1-SMC3) encargadas de la cohesión de las cromátidas hermanas, las **condensinas** (SMC2-SMC4) involucradas en la condensación de los cromosomas, y un **tercer tipo** formado por SMC5-SMC6 que está implicado en la reparación del DNA. En procariotas el complejo SMC es algo más sencillo ya que está formado por homodímeros de la misma proteína SMC aunque la función que desempeñan es equivalente a las eucariotas.



**Figura 3.3. Importancia del empaquetamiento del DNA en el nucleo/nucleolo de la célula. a)** Imagen de microscopía electrónica del DNA cromosómico extraído del nucleolo por lisis suave de la bacteria *E. coli*. **b)** Modelo del DNA cromosómico condensado en el núcleo. Imágenes adaptadas de (Wang, 2013).

En la **Figura 3.3** se muestra el DNA cromosómico saliendo del núcleo de la bacteria *E. coli* tras una lisis suave (Wang, 2013). Una de las funciones de las proteínas SMC es condensar el DNA en el núcleo (o nucleoide) tras la replicación, aunque los mecanismos que regulan estos procesos se desconocen actualmente.

En el caso de *Bacillus subtilis* el complejo SMC está formado por tres proteínas: la proteína SMC y dos proteínas suplementarias llamadas ScpA y ScpB (del inglés *segregation and condensation proteins*). Un monómero de proteína SMC está formado por un dominio globular, “cabeza”, que contiene los extremos terminales amino y carboxilo, una región flexible y larga (~ 50 nm) formada por una estructura superenrollada (*coiled-coil*) que forma los “brazos” y una segunda región globular en el centro de la cadena polipeptídica, un dominio “bisagra”, donde la proteína se dobla sobre sí misma para conectar de nuevo ambos extremos terminales en la cabeza (ver **Figura 3.4** para más detalle). El dominio “bisagra” sirve como dominio de dimerización de la proteína, de forma que un monómero se une al dominio homólogo de otro monómero (Melby, 1998) (Haering, 2002) (Hirano, 2002). Debido a la gran longitud (~ 50 nm) de la cadena que forma la estructura *coiled-coil* la proteína es muy flexible y puede adoptar diferentes conformaciones, desde una estructura cerrada en forma de anillo, abierta en forma extendida o en forma de V que caracteriza a ésta familia de proteínas. Los extremos amino y carboxilo terminal contienen una región bi-partida de unión a nucleótido de forma que dos moléculas de ATP pueden unirse entre el extremo N-terminal de un monómero y el C-terminal de otro monómero y viceversa. Por lo tanto, el dímero puede adoptar una estructura cerrada en presencia de ATP.

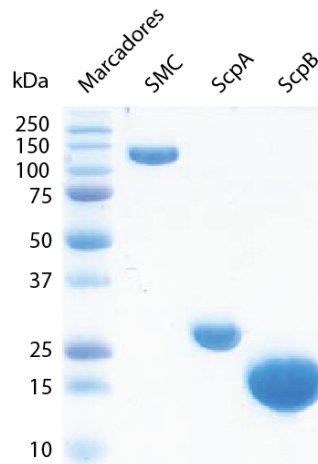


**Figura 3.4. Esquema del complejo SMC de *Bacillus subtilis*.** Los dos monómeros están representados con distintos tonos de marrón para que se observe la dimerización por el dominio “bisagra”. Las dos moléculas de ATP situadas entre el dominio C-terminal de un monómero y el N-terminal de otro indica la región de unión de ATP. La representación de las proteínas suplementarias ScpA y ScpB se ha realizado siguiendo la estructura cristalográfica del complejo análogo en *E. coli* MukBEF (Woo, 2009) y la reciente estructura cristalográfica de *BsSMC* (Bürmann, 2013).

Por otra parte, las dos proteínas suplementarias, ScpA y ScpB, interaccionan con el dominio “cabeza” de SMC y su función consiste en regular la hidrólisis de ATP del dímero de SMC favoreciendo el cierre del anillo o por el contrario, su apertura.

### 2.3.1. Purificación de proteínas del complejo SMC

Las proteínas del complejo SMC de *Bacillus subtilis* fueron purificadas por el grupo del Dr. Mark Dillingham (Universidad de Bristol, UK). Los detalles de la purificación se encuentran en (Fuentes-Perez, 2012) y el correspondiente material suplementario. En la **Figura 3.5** se muestra un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con las tres cadenas polipeptídicas que forman el complejo SMC: proteína SMC, ScpA y ScpB.



**Figura 3.5. Purificación de las proteínas del complejo SMC.** Gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) de las tres cadenas polipeptídicas que forman el complejo SMC (proteína SMC, ScpA y ScpB) junto con un marcador del peso molecular. El gel ha sido realizado por el grupo del Dr. Mark Dillingham.

Además de la proteína SMC nativa, también se purificó un mutante (SMC<sup>E1118Q</sup>) que es capaz de unir dos moléculas de ATP entre las cabezas pero no de hidrolizarlas. De esta manera, es posible estudiar el comportamiento de la proteína en presencia de ATP.

### 2.3.2. Preparación de las muestras para AFM

Los componentes del complejo SMC se añadieron primero individualmente en el tampón de reacción compuesto por 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5 mM NaCl y 0.25 mM MgCl<sub>2</sub> a concentraciones finales de 16.3 nM (SMC<sup>E1118Q</sup>), 24 nM (ScpA) y 18 nM (ScpB). Después, se añadieron moléculas de DNA de 323 bp de longitud (moléculas de referencia) a una concentración final de 3.3 nM.

Por último, la reacción se completó con una concentración final de 7.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  hasta alcanzar un volumen de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla se depositó en la mica recién exfoliada durante 30 segundos aproximadamente, se lavó con 3 ml de agua filtrada Milli-Q y se secó con nitrógeno gas.

En los experimentos de interacción entre proteínas del complejo SMC la reacción se realizó a concentraciones más altas (rango micromolar) para favorecer las interacciones entre proteínas. Posteriormente se diluyeron a concentraciones en el rango de nanomolar para poder ser vistas con el AFM sin que se cubra completamente la mica de proteína.

Los diferentes tipos de proteínas se mezclaron primero de dos en dos a concentraciones en el rango micromolar ( $\text{SMC}^{\text{E1118Q}}$  (0.74  $\mu\text{M}$ ), ScpA (1.1  $\mu\text{M}$ ) y ScpB (0.82  $\mu\text{M}$ )) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos en el mismo tampón de reacción. En el experimento con las tres proteínas se incubó primero SMC con ScpA durante 2 minutos y después se añadió ScpB y se incubó durante 2 minutos más. Las reacciones se diluyeron en el tampón de reacción a la concentración del rango nanomolar antes de depositarlas en la mica. La reacción se completó añadiendo moléculas de DNA (3.3 nM) y  $\text{MgCl}_2$  (7.5 mM) hasta alcanzar un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . La reacción se depositó en la superficie de la mica previamente exfoliada durante 30 segundos aproximadamente, se lavó con 3 ml de agua filtrada Milli-Q y se secó con nitrógeno gas.

## 2.4. Medidas de volumen de moléculas de DNA de hebra sencilla

El DNA de cadena sencilla (ssDNA, por sus siglas en inglés de *single stranded DNA*) es un intermediario clave en muchos procesos del ciclo celular. En la replicación y transcripción, las helicasas abren la doble hélice creando DNA de hebra sencilla que posteriormente la polimerasa emplea como sustrato. En el proceso de la reparación homóloga una hebra de cadena sencilla actúa como sustrato para recuperar la información genética perdida. Otros ejemplos que ilustran la importancia y función de ssDNA son (Taylor, 1980) (Seidel, 2004) (Yeeles, 2011) (Brown, 2005) (Hamon, 2007).

La caracterización de la longitud de contorno de moléculas de DNA de doble hebra se realiza directamente a partir de las imágenes de AFM siguiendo la trayectoria de la molécula. Sin embargo, la caracterización de moléculas de ssDNA no se puede realizar directamente debido a que forman estructuras secundarias: la cadena de nucleótidos se pliega sobre sí misma debido a la interacción entre sus nucleótidos complementarios, adquiriendo una forma globular. De hecho, la longitud de persistencia de las moléculas de DNA de hebra sencilla se considera próxima a 1 nm (Bosco, 2014). La técnica de análisis volumétrico desarrollada aquí proporciona un nuevo método para caracterizar moléculas de DNA de hebra sencilla relacionando el volumen con la longitud (en nt) de las moléculas de ssDNA.



### 2.4.1. Fabricación de moléculas de ssDNA

La desnaturalización de las moléculas de DNA se produce tras la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas complementarias. Esta separación física de las dos hebras de DNA se puede producir por calor, álcali u otros compuestos químicos. La desnaturalización por calor se produce alrededor de los 90°C (en función del contenido de GCs) y por álcali a pH superiores a 11.3 (Rojo, 1993). En ambos casos el proceso es reversible y tras la eliminación del agente desnaturalizante las dos hebras se vuelven a alinear recuperando la estructura helicoidal.

En nuestro caso, las moléculas de ssDNA se prepararon mediante desnaturalización por calor a partir de moléculas de DNA de doble hebra que fueron calentadas a 95°C durante 10 minutos e inmediatamente después colocadas en hielo para evitar la renaturalización de las moléculas. Las moléculas de DNA mantuvieron su estructura de hebra sencilla a temperatura ambiente y a 37°C durante al menos 30 min, por lo que el tiempo de preparación de las muestras que típicamente no alcanza los 5 minutos no afectaba a la rehibridación de las moléculas.

Las moléculas de DNA de cadena doble, a partir de las cuales se obtuvieron las de cadena sencilla, se fabricaron siguiendo los protocolos siguientes: 1) **Moléculas de 323 bp**. Este fragmento lineal se preparó por PCR usando el protocolo proporcionado por el Kit Go-Taq PCR Core System II (Promega). El producto de PCR fue purificado usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (Quiagen); 2) **Moléculas de 657 bp**, 3) **1552 bp** y 4) **2209 bp**. Estos fragmentos de DNA fueron producidos a partir del plásmido pSP73-JY0 (Yeeles, 2010) por una reacción de corte con las enzimas de restricción SpeI y BbvCI, XhoI y SpeI, y XhoI y BbvCI, respectivamente. Los tiempos de las reacciones de digestión fueron optimizados para obtener una distribución uniforme de moléculas de la longitud adecuada. De manera general, las reacciones de digestión contenían una relación de 0.1 unidades de enzima de restricción por cada 16 nM del plásmido en un volumen final de 10 µl. El tiempo de incubación empleado en reacciones de corte fue de 12 minutos a 37°C seguido de un paso de inactivación durante 20 minutos a 80°C. Los productos de restricción fueron purificados mediante extracción de la banda correspondiente de un gel de agarosa (0.7%) y purificados con el Kit de Extracción de Gel QIAquick (Quiagen); y 5) **Moléculas de 2743 bp**. Este fragmento corresponde al vector pGEM3Z (Promega) que previamente fue linearizado con la enzima de restricción BamHI-HF. El producto de esta digestión fue purificado con el Kit de Purificación de PCR QIAquick (Quiagen).

### 2.4.2. Preparación de las moléculas de ssDNA para el AFM

Las reacciones finales que se depositaron en la mica para obtener la imagen de AFM contenían: de 1 a 5 nM de ssDNA (10 mM TrisHCl pH 8.5) dependiendo de la longitud de las moléculas y 3 nM de dsDNA de 323 bp de longitud (10 mM TrisHCl pH 8.5) como molécula de referencia para las medidas

de volumen, todo preparado en un volumen final de 10  $\mu$ l en un tampón que contiene 2.5 mM TrisHCl 7.5 y 10 mM de  $MgCl_2$ . La reacción fue depositada en la mica previamente exfoliada durante  $\sim 30$  segundos y lavada con agua MilliQ (Millipore) y posteriormente secada con un chorro de nitrógeno gas.

### 3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue la aplicación de un método para medir volúmenes de proteínas y ácidos nucleicos a partir de imágenes de microscopía de fuerzas atómicas.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos.

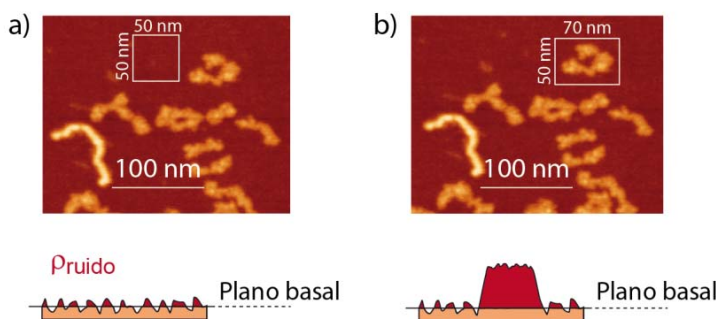
1. Desarrollar un método para medir volúmenes de objetos nanométricos, como de proteínas tanto globulares como no globulares, a partir de imágenes de AFM, que permita comparar los datos obtenidos en distintos días y con distintas puntas.
2. Caracterizar el complejo SMC de *Bacillus subtilis* mediante el análisis de volumen para obtener información de la estequiometría de las proteínas que forman el complejo así como las interacciones entre ellas.
3. Identificar la longitud (en nucleótidos) de moléculas de DNA de hebra sencilla mediante el análisis de volumen de las mismas.

## 4. Resultados experimentales

### 4.1. Descripción de una nueva aproximación para medir volúmenes que utiliza el DNA como molécula de referencia.

El método para calcular volúmenes que se ha desarrollado en esta tesis está basado en los métodos directos previamente descritos en la literatura, por lo que permite estudiar tanto proteínas globulares como no globulares, pero al que hemos incorporado dos ideas nuevas: la introducción del DNA como molécula de referencia y la utilización de la densidad de ruido para substraer la contribución del ruido de fondo correspondiente para cada proteína.

Comenzaremos por describir cómo se mide el volumen de un objeto a partir de las imágenes de AFM. Para ello, utilizaremos como objeto a las proteínas de mantenimiento estructural (SMC). Lo primero que se hace antes de medir el volumen es obtener un plano basal o plano medio de la superficie sobre el cual está adsorbido el objeto. El plano basal se calcula en una región de la imagen que esté adyacente al objeto que se quiere estudiar y que no contenga ningún objeto. En la **Figura 3.6 (a)** se muestra un ejemplo en el que la región adyacente a una proteína SMC tiene un plano basal de altura media  $H = 1.87 \text{ \AA}$ . Es importante comprobar que el plano basal no cambia en otras regiones adyacentes a la proteína.



**Figura 3.6. Medida de volúmenes a partir de imágenes de AFM.** a) Primero se selecciona una región adyacente al objeto de interés y se calcula el plano basal y la densidad de ruido (volumen por área) representada en rojo. b) Segundo, se selecciona el área que contiene el objeto de interés y se calcula el volumen por encima del plano basal obtenido en la región desnuda. Este volumen (representado en rojo) tendrá la contribución del volumen de la proteína y del volumen de ruido que posteriormente se elimina empleando la densidad de volumen de ruido obtenida en la región que no contiene proteína.

Dado que las imágenes de AFM son imágenes topográficas que proporcionan información de la altura en cada píxel, es posible obtener el volumen suman-

do la contribución de cada uno de los píxeles que contienen el objeto por encima del plano basal (**Ecuación 3.7**).

$$V = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N ((h_{ij} - H) \cdot p^2) \quad (3.7)$$

donde la imagen tiene un área de  $M \times N$  píxeles,  $h_{ij}$  es la medida de la altura en el píxel de coordenadas  $(i, j)$  y  $p$  es el tamaño del píxel.

La aplicación de la **Ecuación 3.7** a la imagen de la **Figura 3.6 (a)** determina el volumen de ruido de fondo que posee nuestro sistema experimental, cuyo origen se atribuye a ruidos electrónicos inherentes en la medida, ruidos térmicos y/o a posibles efectos de la preparación de la muestra (como adsorción de sal, de tampón o de otros componentes). A partir de este volumen se calcula la **densidad de volumen de ruido** que contiene la imagen. En este caso particular, la densidad de volumen de ruido tiene un valor de:  $\rho_{ruido} = 0.0144 \text{ nm}^3/\text{nm}^2$  ( $35.8 \text{ nm}^3/(50 \times 50 \text{ nm}^2)$ ).

Una vez obtenido el plano basal se selecciona el área que contiene a la proteína y se repite la misma operación de medida del volumen. Este volumen tiene la contribución del volumen de ruido de la imagen y el volumen de la proteína que deseamos obtener. Si suponemos que la densidad de ruido no varía entre zonas adyacentes en la imagen, podemos emplear la densidad de ruido obtenida anteriormente para sustraer el volumen proporcional de ruido que hay en el área empleada para calcular el volumen del objeto de interés, como se muestra en la **Ecuación 3.8**.

$$V_{AFM} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N ((h_{ij} - H) \cdot p^2) - V_{ruido} \quad (3.8)$$

donde  $V_{ruido}$  representa el volumen de ruido correspondiente a la imagen de área  $M \times N$  píxeles como se indica en la **Ecuación 3.9**, donde  $\rho_{ruido}$  es el valor obtenido en la región adyacente a la de la proteína.

$$V_{ruido} = \rho_{ruido} \cdot M \cdot N \cdot p^2 \quad (3.9)$$

En el ejemplo de la **Figura 3.6**, el volumen de la molécula de SMC antes de la sustracción del volumen de ruido era de  $660 \text{ nm}^3$ , mientras que el volumen obtenido tras la sustracción del volumen de ruido correspondiente es de  $613 \text{ nm}^3$ . A pesar de que la densidad de volumen de ruido permite corregir el volumen para cada proteína y en cada imagen, también es importante que los datos del volumen obtenidos sean comparables en distintos experimentos. Para ello, es necesario introducir un objeto de referencia en la imagen.

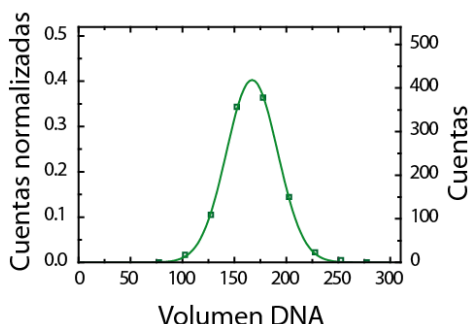
El uso de **moléculas de DNA como moléculas de referencia** tiene varias ventajas. En primer lugar, está igualmente afectado por efectos de dilación, deshidratación, efectos de deriva térmica, *creep*, compresión de la punta, etc. producidos durante la medida. En segundo lugar, el DNA es una molécula que se absorbe a la superficie de la mica con facilidad, empleando el mismo tampón que las proteínas, lo que permite la co-adsorción con proteínas. Además, su particular geometría las distingue fácilmente de otros objetos.

Finalmente, el hecho de que las moléculas de DNA tengan una altura (1 nm aprox.) similar a las proteínas (entre 0.5 nm y 5 nm) es una ventaja adicional porque minimiza las diferencias en la dilatación, ya que ésta depende fuertemente de la altura de los objetos.

Las moléculas de DNA se co-adsorbieron junto con las proteínas SMC y el volumen de la proteína se normalizó por el volumen medio de un pequeño fragmento de DNA (ver **Ecuación 3.10**). Se emplearon fragmentos de moléculas de DNA contenidos en una ventana de 20 x 20 nm<sup>2</sup> como volumen de referencia (ver información sobre la elección del volumen de referencia en la Sección 4.6.1) a los que se les substrajo el volumen de ruido correspondiente como se describió anteriormente. Los volúmenes normalizados de la proteína son ahora comparables entre distintos experimentos realizados en diferentes días y distintas puntas.

$$v = \frac{V_{proteina}}{\langle V_{DNA\ 20x20nm} \rangle_{imagen}} \quad (3.10)$$

El volumen medio de los fragmentos de DNA (contenidos en ventanas de 20 x 20 nm<sup>2</sup>) fue de 160 ± 28 nm<sup>3</sup> y la distribución de los datos se muestra en la **Figura 3.7**.



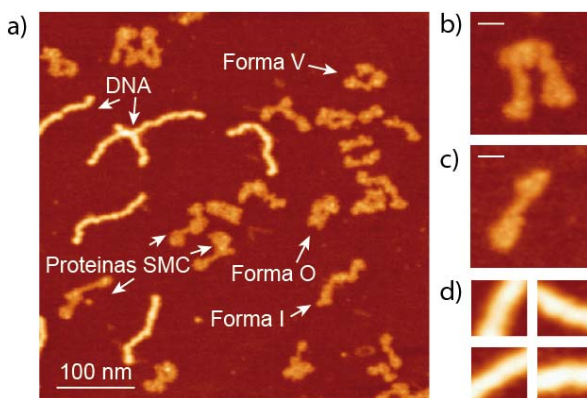
**Figura 3.7. Volumen de referencia de la molécula de DNA.** Distribución del volumen del fragmento de DNA utilizado como referencia. Los datos se han ajustado a una función gaussiana con valor medio 160 nm<sup>3</sup> y desviación estándar 28 nm<sup>3</sup> (N = 1039).

## 4.2. Estudio de las proteínas del complejo SMC

### 4.2.1. Caracterización de las proteínas SMC utilizando la técnica del análisis de volumen

Las proteínas SMC se caracterizan por tener una estructura flexible, adoptando distintas conformaciones cuando están adsorbidas en la mica como se observa en la **Figura 3.8**. En función de la forma geométrica que muestran

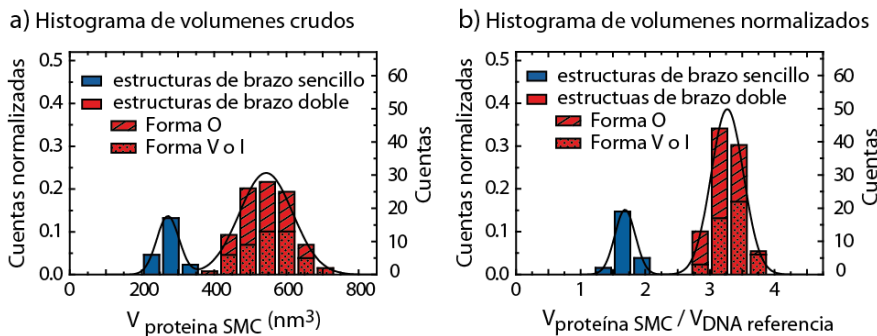
las proteínas SMC las clasificamos como cerradas del tipo “O” o abiertas del tipo “V” o “I”. Las proteínas SMC fueron co-adsorbidas con moléculas de DNA para el posterior análisis de volumen. Ambas moléculas (proteína y DNA) se distinguen fácilmente: las moléculas de DNA tienen forma longitudinal, son más altas,  $1.1 \pm 0.1$  nm, y tienen una longitud de  $109 \pm 4$  nm, mientras que las proteínas SMC son más bajas, la altura varía entre 4 y 9 Å (altura media de  $7 \pm 1$  Å) y la longitud de los brazos es de  $45 \pm 6$  nm.



**Figura 3.8. Proteína SMC.** a) Imagen de AFM característica de proteínas SMC y moléculas de DNA de 323 bp de longitud co-adsorbidas como referencia. Las flechas indican las diferentes conformaciones que puede adoptar la proteína SMC: forma de V (angulada), forma I (longitudinal) y forma de O (cerrada). b) Detalle de una proteína de brazo doble o c) brazo sencillo. La barra de escala en las imágenes representa 15 nm. d) Fragmentos de DNA utilizados como referencia (ventanas de  $20 \times 20$  nm<sup>2</sup>). La escala de color es la misma para todas las imágenes de la figura y va de 0 a 2 nm (de oscuro a brillante).

Con el fin de validar nuestra nueva metodología, medimos el volumen de proteínas SMC siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 2.2 y los representamos en un histograma (Figura 3.9 (a)). Este histograma contiene datos obtenidos en diferentes días y con puntas distintas representando la variabilidad experimental de nuestras medidas con AFM. El histograma muestra dos picos centrados en  $276 \pm 38$  nm<sup>3</sup> y en  $545 \pm 87$  nm<sup>3</sup>. El segundo pico (rojo) corresponde a estructuras de doble brazo y tiene un volumen que dobla al primer pico (azul) de estructuras de brazo sencillo. El error relativo que se obtiene de estas medidas es del 15%, valor que coincide con lo presentado previamente (Ratcliff, 2001) (Neish, 2002) (Minh, 2009).

A continuación, se procedió a normalizar el volumen de las proteínas entre el volumen de DNA, como se describe en la Sección 4.1. El histograma de volúmenes normalizados se muestra en la Figura 3.9 (b). De nuevo se obtienen dos picos, el segundo con un volumen que dobla el primero, centrados en  $1.6 \pm 0.1$  y  $3.1 \pm 0.2$  nm<sup>3</sup>. Sin embargo, el error relativo de los picos de volumen normalizado es del 6%, aproximadamente la mitad de lo presentado previamente por otros grupos (Ratcliff, 2001) (Neish, 2002) (Minh, 2009).



**Figura 3.9. Análisis de volumen de la proteína SMC.** a) Histograma de volúmenes crudos (absolutos) y b) de volúmenes normalizados de la proteína SMC. En ambos histogramas se diferencia las proteínas SMC con estructura de brazo sencillo (azul) o de brazo doble (rojo), así como la forma de O (cerrada) o forma de V (abierta) para los dímeros de SMC. Los datos del histograma han sido ajustados a una curva gaussiana.

La alta resolución de nuestras imágenes nos permitió clasificar los dímeros de SMC en función de su conformación geométrica. Estas conformaciones (abierta tipo V o I, o cerrada tipo O) se incluyen en los histogramas como regiones rayadas o punteadas. En general, no se observó una tendencia clara entre volúmenes y el estado conformacional de la proteína, siendo aproximadamente la mitad de las proteínas las que se encuentran abiertas o cerradas.

La obtención de dos picos, el segundo con el doble volumen del primero, sugiere la presencia de distintos estados oligoméricos de la proteína. Sin embargo, las medidas de volumen con AFM requieren de algún patrón, cuyo volumen y masa molecular sea conocida para poder hacer una calibración. De cara a poder asignarle a nuestras proteínas SMC una masa molecular y por lo tanto atribuirle a los dos picos obtenidos, nuestros colaboradores de la Universidad de Bristol utilizaron la técnica de ultracentrifugación analítica.

La ultracentrifugación analítica es una técnica cuantitativa en la que es posible obtener la masa molecular de proteínas con gran precisión (Vivando, 2002). Cuando las moléculas se someten a campos centrífugos moderados de manera que las fuerzas centrífugas se igualan a las de difusión, se llega a lo que se conoce como equilibrio de sedimentación, y la única variable desconocida es la masa molecular. El gradiente de sedimentación obtenido se ajusta a la fórmula de la [Ecuación 3.11](#) y a partir de ahí se obtiene la masa molecular. Los detalles del experimento se encuentran en el artículo de (Fuentes-Perez, 2012).

$$A_r = A_0 \exp \left[ PM (1 - \bar{v} \rho) (r^2 - r_0^2) (\omega^2 / 2RT) \right] + B \quad (3.11)$$

donde  $PM$  es el peso molecular,  $A_r$  y  $A_0$  son las absorbancias a radio  $r$  y  $r_0$ , respectivamente,  $\bar{v}$  es el volumen parcial,  $\rho$  es la densidad del tampón,  $\omega$  es la velocidad angular y  $B$  es la compensación de la línea basal.



Esta técnica reveló que la proteína SMC era un dímero en solución a concentraciones en el rango del micromolar. Por lo tanto, dado que en los experimentos de AFM están hechos con concentraciones más bajas, del orden del nanomolar, podemos asignar el pico de mayor volumen a la población de dímeros y el pico de menor volumen a la población de monómeros de SMC.

#### 4.2.2. Caracterización de las proteínas ScpA y ScpB utilizando la técnica del análisis de volumen

El mismo análisis se repitió con las dos proteínas suplementarias ScpA y ScpB. Estas proteínas son mucho más pequeñas que la proteína SMC y tienen forma globular como se ve en las imágenes de la **Figura 3.10 (b y c)**.

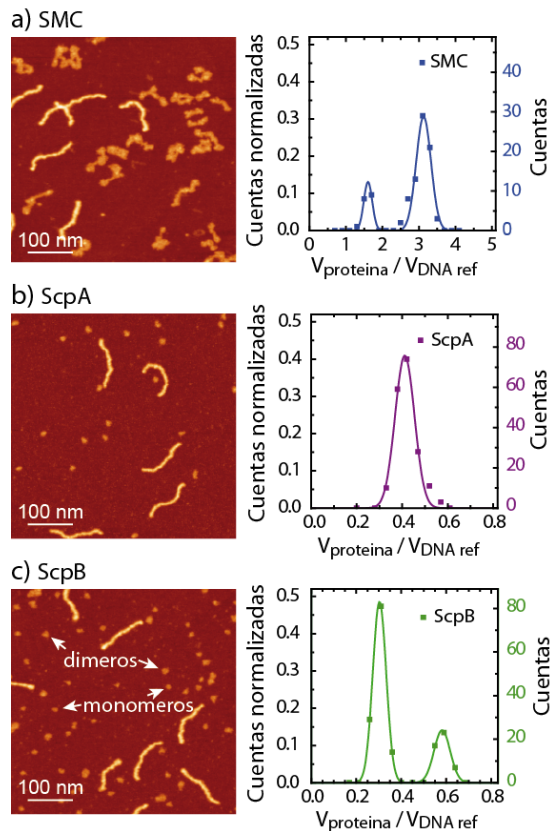


Figura 3.10. Imágenes de AFM e histogramas de volúmenes normalizados de los tres componentes del complejo SMC: a) proteína SMC (azul), b) proteína suplementaria ScpA (morado) y c) proteína suplementaria ScpB (verde). Los datos del histograma (puntos) han sido ajustados a una curva gaussiana (línea). El número de cuentas está normalizado respecto al total: 94, 185 y 171 para SMC, ScpA y ScpB respectivamente.

El volumen normalizado de las proteínas mostró un único pico para la proteína ScpA, centrado en  $0.41 \pm 0.04 \text{ nm}^3$ , y dos picos para la proteína ScpB centrados en  $0.30 \pm 0.03 \text{ nm}^3$  y  $0.58 \pm 0.04 \text{ nm}^3$ .

De nuevo, los experimentos de ultracentrifugación analítica revelaron que la proteína ScpA es un monómero mientras que la proteína ScpB es un dímero en solución. Por lo tanto, podemos atribuir el único pico de ScpA a una población de monómeros y los dos picos de ScpB a la población de monómeros y dímeros respectivamente.

La estequiometría de las proteínas suplementarias ha sido un tema de debate durante bastante tiempo. Los primeros artículos indicaban tanto que ScpA era un monómero y ScpB es un dímero (Volkov, 2003) (Hirano, 2004) (Mascarenhas, 2005), como lo contrario, que ScpA era un dímero y ScpB era un monómero (Hirano, 2006). Actualmente, la estequiometría aceptada por otros autores expertos en el campo como el Dr. Gruber, está de acuerdo con lo que vemos en nuestros experimentos (Gruber, 2014).

### 4.3. Los volúmenes medidos a partir de imágenes de AFM son proporcionales al peso molecular de proteínas

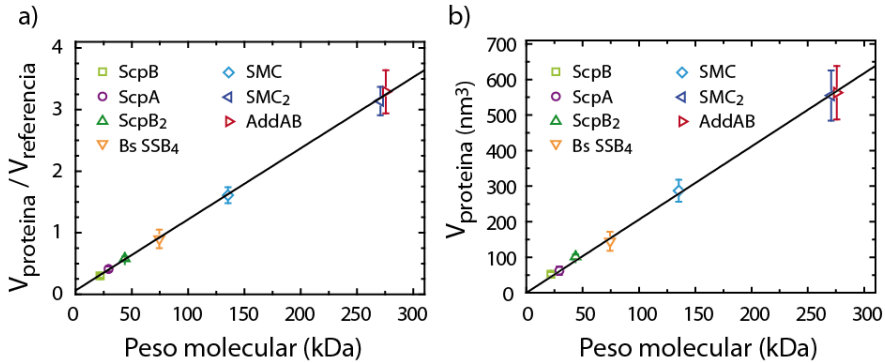
Estudios anteriores han demostrado que los volúmenes de proteínas obtenidos a partir de imágenes de AFM muestran una dependencia lineal frente al peso molecular (Wyman, 1997) (Schneider, 1998) (Ratcliff, 2001) (Neaves, 2009).

Nosotros hemos comprobado este comportamiento con nuestros datos representando el volumen normalizado de las proteínas frente a su peso molecular, como se muestra en la **Figura 3.11 (a)**. Los valores del peso molecular y el volumen normalizado de las proteínas utilizadas se muestran en la

**Tabla 3.2.** El comportamiento lineal del volumen normalizado frente al peso molecular se mantiene tanto para proteínas globulares como para otras con una estructura distinta. Por ejemplo, la proteína AddAB tiene un peso molecular parecido al del dímero de SMC, pero sus estructuras son completamente diferentes. Mientras que AddAB tiene una estructura más compacta (y de mayor altura), el dímero de SMC es más alargado (y de menor altura). No obstante, el volumen normalizado de ambos se ajusta bien en la regresión lineal. Esto resulta sorprendente debido a que la dilación de un objeto más alto es diferente a la de un objeto más bajo. Sin embargo, el efecto de la dilación se ve contrarrestado al compararlo con el DNA y proteínas de diferentes conformaciones obtienen un volumen equivalente. El volumen absoluto de las proteínas representado frente a su peso molecular sigue también una regresión lineal (**Figura 3.11 (b)**) mostrando una desviación estándar de los volúmenes del doble de los volúmenes relativos.

Nuestro análisis se extendió a otras proteínas disponibles en el laboratorio: la helicasa-nucleasa AddAB (Yeeles, 2011) y la proteína de unión a DNA de hebra sencilla SSB (por sus siglas de *Single Stranded Binding proteins*) de *Ba-*

*cillus subtilis*. Las imágenes de AFM y el correspondiente histograma de volúmenes para las dos proteínas se muestran en la **Figura 3.12**. La proteína SSB es un tetrámero estable en solución que tiende a agregar a bajas concentraciones de sal (Witte, 2008). Por lo tanto, los experimentos con SSB se hicieron con una concentración de sal (NaCl) de 100 mM.



**Figura 3.11. Volúmenes de proteínas (ScpB, ScpA, SSB, SMC y AddAB) frente a su peso molecular. a)** Gráfica del volumen normalizado. **b)** Gráfica de los volúmenes absolutos. Los volúmenes normalizados siguen un comportamiento lineal frente al peso molecular del tipo:  $V_{prot}/V_{ref} = 11.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ kDa}^{-1} \times PM + 0.06 \pm 0.01$ .

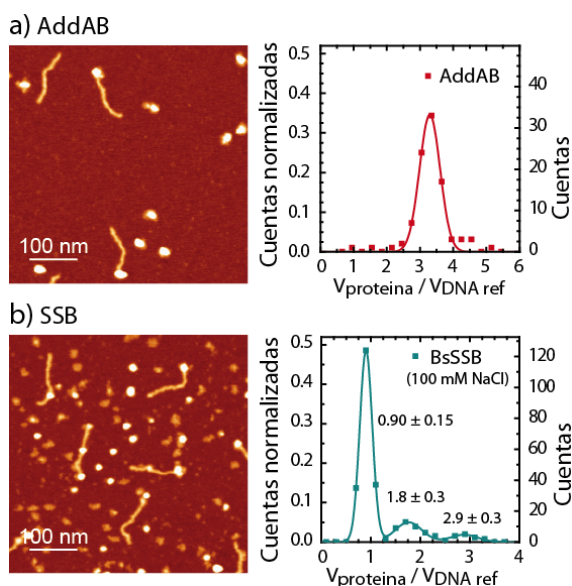
**Tabla 3.2.** Proteínas utilizadas en este trabajo junto con su peso molecular (PM) y el volumen normalizado obtenido con el AFM.

Proteína	PM (kDa)	$V_{AFM}/V_{REF}$
ScpB	21.89	$0.30 \pm 0.03$
ScpA	29.46	$0.41 \pm 0.04$
ScpB <sub>2</sub>	43.78	$0.58 \pm 0.04$
SSB <sub>4</sub>	74.40	$0.90 \pm 0.15$
SMC	135.39	$1.6 \pm 0.1$
SMC <sub>2</sub>	270.78	$3.1 \pm 0.2$
AddAB	275.67	$3.3 \pm 0.7$

Si comparamos los volúmenes experimentales sin normalizar con los datos teóricos calculados con la **Ecuación 3.6**, observamos que ambos se ajustan bastante bien considerando un factor de hidratación de  $\delta = 0.5 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g proteína}$  (en lugar de  $\delta = 0.3 - 0.4 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g proteína}$ ). Esta corrección se traduce en una sobreestimación de los datos experimentales debido principalmente

a la dilución, dado que los volúmenes sin normalizar sí que están afectados por el tamaño de la punta.

El método de análisis volumétrico se puede emplear para obtener el peso molecular de proteínas desconocidas, a partir de una calibración previa con proteínas cuyo peso molecular es conocido.



**Figura 3.12. Caracterización de las proteínas AddAB y SSB.** Imágenes de AFM y su correspondiente histograma de volúmenes de **a)** la helicasa-nucleasa AddAB y de **b)** la proteína SSB de *Bacillus subtilis*. Los volúmenes están normalizados respecto al DNA como para las proteínas del complejo SMC y las cuentas también están normalizadas respecto del número de cuentas totales ( $N = 96$  y  $N = 255$  para AddAB y SSB respectivamente).

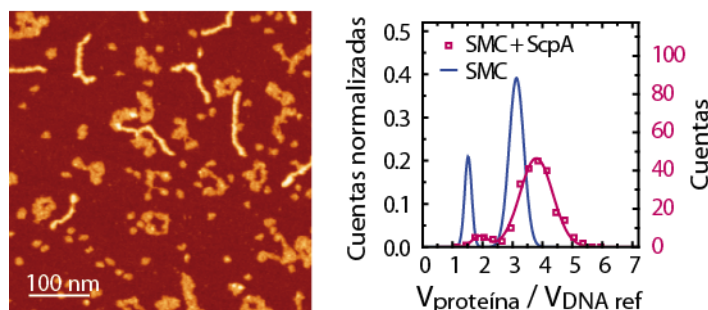
#### 4.4. Interacciones entre los componentes del complejo SMC

Una de las aplicaciones más valiosas del análisis de volumen es estudiar interacciones entre proteínas. Por ejemplo, en el artículo (Schlachter, 2005) estudian la interacción entre las proteínas RecA y Pol V en ausencia de DNA mediante el análisis de volumen a partir de imágenes de AFM.

El complejo SMC está formado por tres proteínas (SMC, ScpA y ScpB) y las interacciones entre ellas juegan un papel importante durante su función celular. Por lo tanto, en esta sección vamos a analizar las interacciones entre las proteínas del complejo SMC a partir del análisis de volumen.

#### 4.4.1. Estudio de la interacción entre SMC y ScpA

Para estudiar interacciones entre los componentes del complejo SMC hicimos experimentos mezclando dos proteínas cada vez. Primero estudiamos las interacciones entre SMC y ScpA. En la **Figura 3.13** se observan las proteínas SMC con su forma característica, las proteínas globulares ScpA y las moléculas de DNA que emplearemos como molécula de referencia.

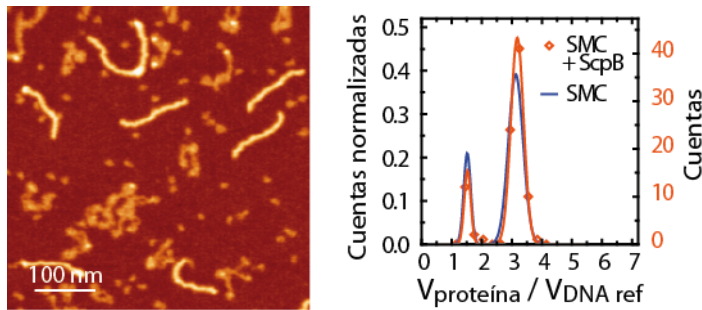


**Figura 3.13. Interacción entre la proteína SMC y ScpA.** Imagen de AFM y su correspondiente histograma de volúmenes normalizados de la reacción de SMC con ScpA (datos y línea púrpura) ( $N = 226$ ). En azul se muestra el ajuste gaussiano de los datos del volumen normalizado de la proteína SMC sola (Figura 3.10 (a)).

La mera inspección de las imágenes de AFM no permite distinguir entre complejos ScpA-SMC o SMC. Sin embargo, el histograma de volúmenes muestra un desplazamiento de los dos picos (monómero y dímero de SMC) hacia volúmenes mayores cuando introducimos ScpA en la reacción (línea púrpura), si lo comparamos con los dos picos (monómero y dímero) de la proteína SMC sola (línea azul). El desplazamiento de los picos corresponde con un 19% y 22% respectivamente respecto a las posiciones originales. Si consideramos una interacción de 1:1 entre SMC y ScpA, el desplazamiento que deberíamos observar según los pesos moleculares sería del 22%. Esto indica que existe una proteína de ScpA unida a cada monómero de SMC.

#### 4.4.2. Estudio de la interacción entre SMC y ScpB

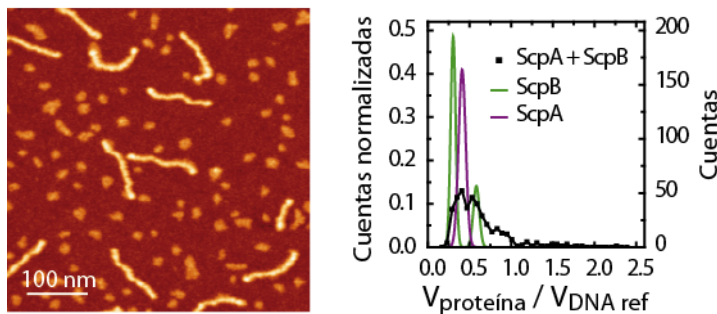
El mismo experimento se repitió con otros dos componentes del complejo SMC, en este caso con las proteínas SMC y ScpB. En la **Figura 3.14** se observan las proteínas SMC, las proteínas globulares ScpB y las moléculas de DNA que utilizaremos como moléculas de referencia. De nuevo, resulta difícil sacar conclusiones sobre la interacción entre proteínas únicamente con una simple inspección visual de las imágenes. Sin embargo, el histograma de volúmenes muestra que el volumen de los monómeros y dímeros de SMC cuando se ha introducido ScpB (línea naranja) coincide con los picos de monómeros y dímeros del experimento de SMC sola (línea azul). Esto indica que las dos proteínas, SMC y ScpB, no están interaccionando.



**Figura 3.14. No interacción entre las proteínas SMC y ScpB.** Imagen de AFM y su correspondiente histograma de volúmenes normalizados de la reacción de SMC con ScpB (datos y línea naranja) ( $N = 91$ ). En azul se muestra el ajuste gaussiano de los datos del volumen normalizado de la proteína SMC sola.

#### 4.4.3. Estudio de la interacción entre ScpA y ScpB

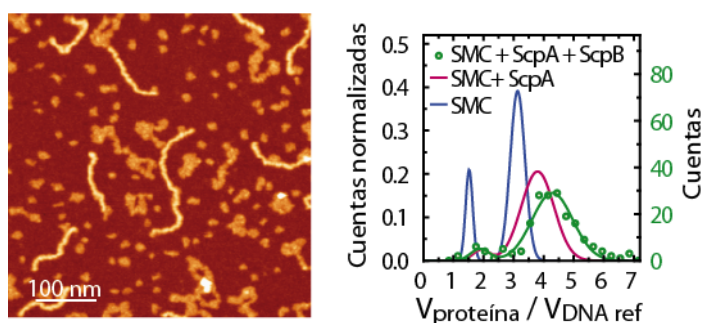
Siguiendo una metodología similar estudiamos la posible interacción entre ScpA y ScpB (**Figura 3.15**). El análisis de volúmenes no resuelve completamente los tres picos correspondientes a ScpB, ScpA y ScpB<sub>2</sub>, pero sí indica la presencia de complejos de mayor tamaño que no se habían visto en los experimentos de las dos proteínas suplementarias solas. El pico correspondiente a la interacción entre ScpA-ScpB (centrado teóricamente en 0.65) solaparía con el de la proteína ScpB<sub>2</sub> y es difícil sacar una conclusión de esta posible interacción. Sin embargo, se observa un pico centrado en 0.93 que coincide muy bien con lo esperado para la interacción entre ScpA-ScpB<sub>2</sub>. Además, se observaron otros complejos de mayor tamaño con menor frecuencia que corresponden con la cola del histograma.



**Figura 3.15. Interacción de las dos proteínas suplementarias del complejo SMC.** Imagen de AFM y su correspondiente histograma de volúmenes normalizados de la reacción de ScpA con ScpB (datos y línea negra) ( $N = 253$ ). En verde y morado se muestran los ajustes gaussianos de los datos del volumen normalizado de la proteína ScpB y ScpA sola, respectivamente.

#### 4.4.4. Estudio de la interacción entre los tres componentes del complejo SMC

Por último, se realizó el experimento con los tres componentes del complejo SMC (**Figura 3.16**). El análisis de volumen muestra un nuevo desplazamiento de los picos del monómero y dímero de SMC hacia volúmenes mayores (línea verde) en comparación con los datos de SMC-ScpA (línea rosa). Esto sugiere que la proteína ScpB está interaccionando con SMC en presencia de ScpA. El pico del dímero de SMC se ha desplazado un 13% respecto al del SMC-ScpA o un 39% respecto al de la proteína SMC sola. El desplazamiento teórico calculado a partir de los pesos moleculares de las proteínas correspondería con un 27% para el caso del complejo  $\text{SMC}_2\text{-ScpA-ScpB}_2$  y con un 54% en el complejo  $\text{SMC}_2\text{-ScpA}_2\text{-ScpB}_4$ . Por lo tanto, los datos experimentales corresponden con un desplazamiento intermedio lo que sugiere la formación de ambos complejos ( $\text{SMC}_2\text{-ScpA-ScpB}_2$  y  $\text{SMC}_2\text{-ScpA}_2\text{-ScpB}_4$ ) a pesar de no tener la resolución suficiente para distinguirlos.



**Figura 3.16. Interacción de los tres componentes del complejo SMC.** Imagen de AFM y su correspondiente histograma de volúmenes normalizados de la reacción de SMC, ScpA y ScpB (datos y línea negra) ( $N = 253$ ). En verde y rosa se muestran los ajustes gaussianos de los datos del volumen normalizado de la proteína ScpB y ScpA sola, respectivamente.

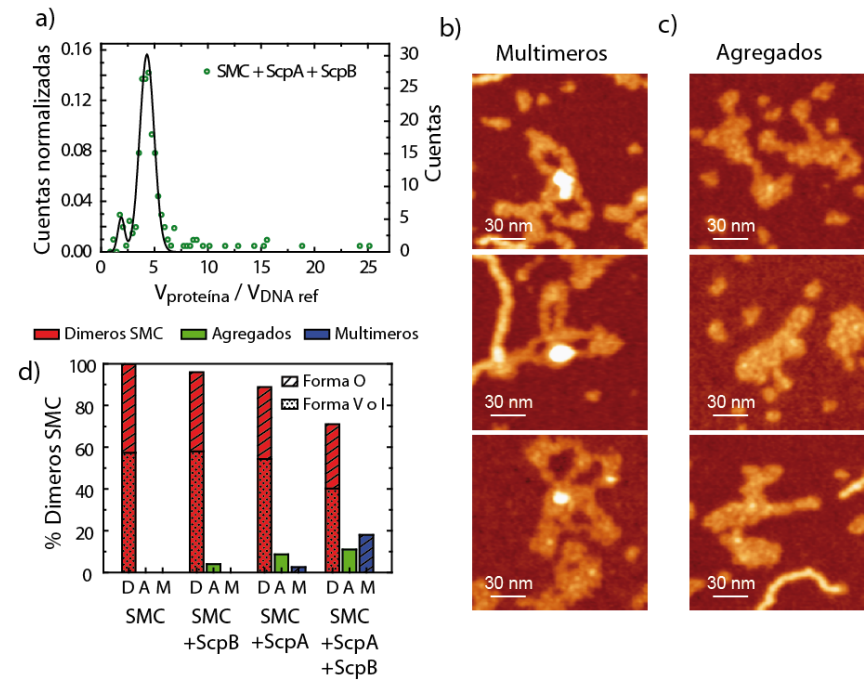
Dado que el AFM nos permite distinguir entre conformaciones de las proteínas (abiertas o cerradas) se repitió el análisis de volumen para intentar relacionar complejos de mayor o menor tamaño con una conformación específica. Sin embargo, no se encontró una tendencia clara entre el volumen y la conformación de las proteínas SMC, encontrando aproximadamente el 50% de proteínas abiertas y cerradas (datos no mostrados).

Además, la presencia de las proteínas suplementarias produjo la formación de estructuras de mayor tamaño que no habían sido vistas en experimentos anteriores. En la **Figura 3.17 (a)** se muestra el mismo análisis de volumen que en la **Figura 3.16** pero ahora con la escala ampliada a volúmenes mayores. La cola de volúmenes mayores corresponde con estructuras de mayor tamaño que hemos clasificado como: *multímeros* (**Figura 3.17 (b)**), a aquellas donde los dímeros de SMC tienen una forma ordenada con un punto bri-



llante en el centro, y *agregados* (Figura 3.17 (c)), a las que no tienen una estructura ordenada.

La formación de *multímeros* está favorecida por la presencia de proteínas suplementarias. En la Figura 3.17 (d) se observa que el 18% de los dímeros de SMC forman multímeros en presencia de las proteínas suplementarias, mientras que únicamente se observa un 2% o menos cuando hay una única proteína suplementaria o ninguna. Los multímeros se caracterizan por tener dímeros de SMC bien ordenados, con forma cerrada, que interaccionan por el dominio cabeza. Los multímeros de SMC han sido observados previamente por (Mascarenhas, 2005) y han sido propuestos como un modelo en el cuál las moléculas de SMC forman estructuras de roseta a la vez que compactan el DNA. Estos modelos involucran a un gran número de dímeros. En nuestros experimentos, los multímeros que observamos no son de gran tamaño sino que involucran a 4 dímeros como mucho.



**Figura 3.17. Formación de estructuras de mayor tamaño en presencia de las proteínas suplementarias.** a) Histograma de volúmenes normalizados del experimento con las tres proteínas (SMC, ScpA y ScpB) ampliado a volúmenes mayores. b) y c) Ejemplos de multímeros y agregados respectivamente. d) Porcentajes de aparición de las estructuras de mayor tamaño: agregados (verde) y multímeros (azul) respecto al número de dímeros.

Por el contrario, los *agregados* aparecen cuando hay al menos una proteína suplementaria presente junto con SMC. En el experimento con las tres pro-



teínas del complejo SMC su presencia es moderada, en torno al 11% respecto al número total de dímeros.

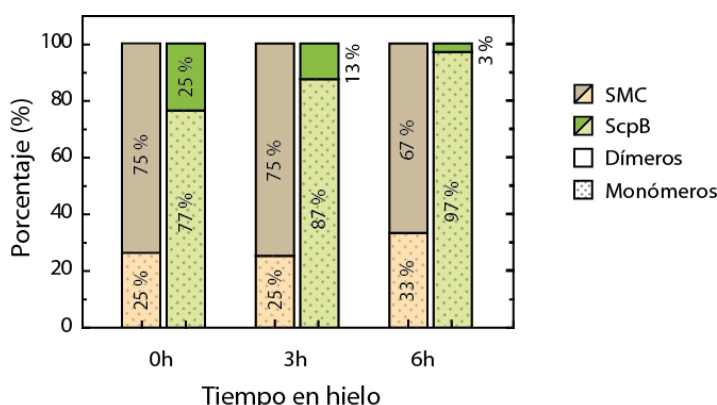
Para confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis de volumen nuestros colaboradores hicieron experimentos de filtración en gel, una técnica que permite separar complejos en función de su tamaño: los complejos de mayor tamaño (proteínas que interaccionan) eluyen primero que los complejos más pequeños (proteínas individuales). Por lo tanto, incubando las proteínas tal y como se hizo en los experimentos de AFM y haciéndolas pasar por la columna de gel, se confirmó que la proteína ScpA interacciona con ambas proteínas (SMC y ScpB) mientras que no hay evidencia de una interacción directa entre las proteínas SMC y ScpB (Fuentes-Perez, 2012).

#### 4.5. Estabilidad estequiométrica

Dado que las concentraciones que se utilizan para los experimentos de AFM son muy pequeñas (orden de las decenas de nanomolar) es interesante estudiar las diferencias entre estos experimentos y los experimentos en *bulk* que generalmente se hacen a concentraciones mayores (centenas de nanomolar o micromolar). La disociación de proteínas depende de muchos factores: de la estabilidad química, de la temperatura, de la concentración, entre otros. En esta sección vamos a estudiar mediante el análisis de volumen cómo evoluciona el número de monómeros y dímeros a lo largo del tiempo (entre 0 y 6 horas) a concentraciones nanomolares.

Para estudiar la estabilidad de las proteínas en hielo, se han preparado tres reacciones de proteína SMC (concentración final 17 nM) y otras tres de ScpB (concentración final 27 nM), tal y como se ha descrito en Sección 2.3.2. Las tres reacciones se dejaron en hielo y se depositaron en la mica a diferentes tiempos: una inmediatamente después de preparada, otra a las 3 horas y la última a las 6 horas.

En la **Figura 3.18** se observa la evolución de la población de monómeros y dímeros de las proteínas SMC y ScpB a lo largo del tiempo. La proteína SMC es estable durante las tres primeras horas, con un porcentaje de dímeros constante e igual al 75% de la población observada. Este porcentaje corresponde muy bien con lo observado en el análisis de volumen donde la población de dímeros era del 78%. La población de dímeros disminuye ligeramente a las 6 horas de comenzar el experimento llegando a un 67% de la población total. Esto indica que la interacción por el dominio eje de la proteína SMC es estable durante un periodo de tiempo largo, suficiente para realizar los experimentos.



**Figura 3.18. Estabilidad de la población de monómeros y dímeros de SMC y ScpB.** Histograma de estabilidad de los dímeros y monómeros de las proteínas SMC y ScpB cuando se dejan en hielo durante distintos tiempos: tiempo cero, 3 horas y 6 horas.

La proteína suplementaria ScpB tiene una población de dímeros mucho más pequeña que SMC. El porcentaje de dímeros es del 25% cuando comienza el experimento, similar a los resultados obtenidos durante el análisis de volumen donde el pico del dímero correspondía con el 27% de la población total. Según avanza el tiempo, la población de dímeros cae drásticamente hasta un 3% a las 6 horas, lo que significa que la proteína ya no es capaz de interactuar formando dímeros. Esto quiere decir que si la proteína ScpB requiere de su forma como dímero para realizar su función, es recomendable emplear nuevas alícuotas cada vez.

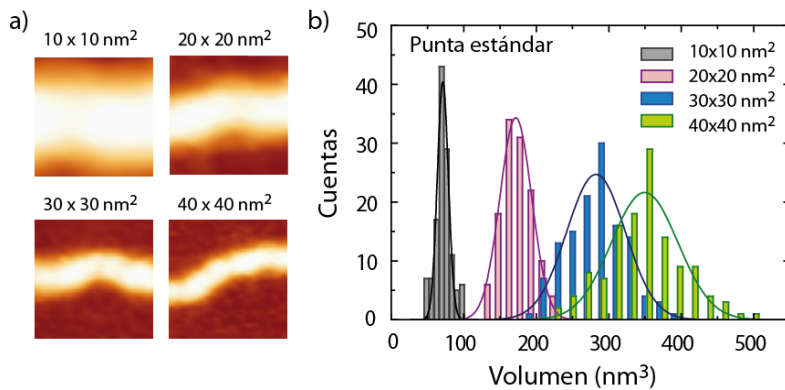
## 4.6. Consideraciones técnicas sobre el cálculo de volúmenes

En este capítulo se ha desarrollado una nueva aproximación para medir volúmenes a partir de imágenes de AFM aplicado con éxito a proteínas del complejo SMC. Sin embargo, hay algunas consideraciones técnicas de las que no hemos hablado todavía, como son: la elección del DNA como volumen de referencia y la influencia del tamaño de la punta.

### 4.6.1. Elección del volumen de referencia de DNA

La elección de un objeto que actúe como volumen de referencia es algo importante para poder comparar datos tomados en distintos días y con distintas puntas. El objeto empleado como referencia debe de cumplir varios requisitos: 1) debe de verse afectado por los mismos artefactos que los objetos que se quieren estudiar, como por ejemplo, la deshidratación en el caso de muestras biológicas; 2) el volumen de referencia debe de ser idealmente un volumen parecido a las moléculas que se quieren estudiar.

Las moléculas de DNA cumplen estos requisitos. Pueden co-adsorberse fácilmente junto con las proteínas que se desee estudiar y tienen la gran ventaja de que pueden ser fácilmente distinguidas por su característica forma longitudinal. Para reducir la dispersión de los datos, se debe elegir como referencia una pequeña región de la molécula, y el DNA tiene la ventaja de que cualquier parte de la molécula es equivalente a otra. Idealmente, la región empleada como referencia debe ser lo más pequeña posible para minimizar las variaciones en la flexión de la molécula debido a la longitud de persistencia intrínseca en las moléculas de DNA, y por otro lado, tiene que ser lo suficientemente grande para que la anchura de la molécula se encuentre dentro de dicha ventana.



**Figura 3.19.** a) Diferentes áreas con moléculas de DNA. b) Distribución de los volúmenes de DNA medidos con cada una de las áreas mostradas en a).

Para obtener el tamaño óptimo de la ventana de DNA que debemos utilizar como referencia, medimos diferentes volúmenes de referencia utilizando áreas de diferentes tamaños: 10 x 10 nm, 20 x 20 nm, 30 x 30 nm y 40 x 40 nm (**Figura 3.19 (a)**). Los resultados se muestran en la **Figura 3.19 (b)** donde se han medido más de 100 áreas de DNA para cada tamaño. La dispersión de los datos es mayor en regiones mayores debido a que las moléculas de DNA son flexibles y pueden contener fragmentos más curvos o más rectos. Por otra parte, áreas pequeñas (de 10 x 10 nm) muestran una dispersión de los datos menor, pero si se observa la imagen ampliada para este caso (**Figura 3.19 (a)**) se aprecia que esta región no es suficiente para contener la molécula de DNA completa. A la vista de estos resultados, decidimos tomar como referencia un área de 20 x 20 nm.

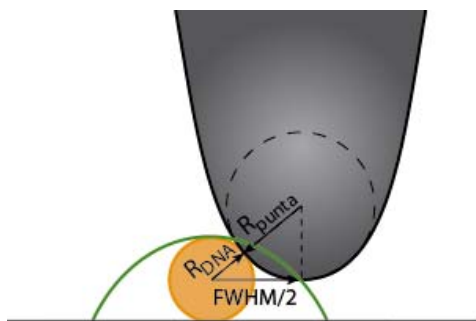
A veces, los extremos finales de las moléculas de DNA son más brillantes que el resto de la molécula (Billingsley, 2010). Esto ocurre cuando el método de adsorción empleado no “pega” irreversiblemente las moléculas a la superficie, como ocurre con el magnesio. Por tanto, los extremos finales pueden fluctuar y en ciertas ocasiones estar levantados cuando se prepara la mues-

tra. Es importante evitar estas regiones cuando se obtiene el volumen de referencia.

#### 4.6.2. Tamaño de la punta

La elección de la punta es importante a la hora de tomar imágenes de AFM, dado que puntas con dimensiones diferentes producirán un efecto de convolución diferente entre la punta y la muestra. Es decir, puntas con radio de curvatura mayor producirán una dilación mayor, mientras que puntas más afiladas producirán una dilación menor. Por lo tanto, el volumen del objeto está directamente afectado por el radio de la punta utilizada.

Para estudiar el efecto del tamaño de la punta en las medidas de volumen, se han utilizado dos puntas distintas: 1) una punta estándar con un radio de curvatura menor de 10 nm según las especificaciones del fabricante (Point-ProbePlus PPP-NCH, Nanosensors); y 2) una punta ultrafina con un radio de curvatura menor de 4 nm según las especificaciones del fabricante (ACT-SS ultrasharp de Nanosensors). Ver **Tabla 1.1** para más detalle.



**Figura 3.20. Aproximación geométrica empleada para estimar el tamaño de la punta a partir de un perfil de una molécula de DNA.** Los datos conocidos son la anchura a media altura (FWHM) y el radio de la molécula de DNA. El esquema no está hecho a escala real.

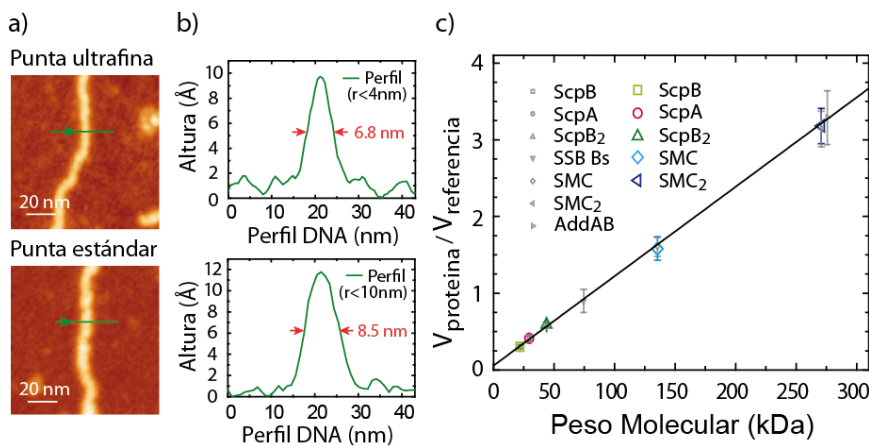
Lo primero que se necesita obtener es el radio real de la punta durante los experimentos, dado que el radio proporcionado por el fabricante tiene un rango de error y la punta puede ser dañada al entrar en contacto con la superficie. El radio de la punta se puede estimar, si consideramos la aproximación geométrica que se muestra en la **Figura 3.20**.

A partir del perfil de un objeto cuyas dimensiones son conocidas, como por ejemplo una molécula de DNA cuyo radio es de 1 nm, y considerando la punta esférica se llega a la siguiente relación:

$$(R_{punta} + R_{DNA})^2 = (FWHM / 2)^2 + R_{punta}^2 \quad (3.12)$$

Imágenes de DNA tomadas con los dos tipos de puntas indicadas previamente, junto con sus correspondientes perfiles se muestran en la **Figura 3.21 (a)** y **(b)**. El radio de la punta que se obtiene aplicando la **Ecuación 3.12** es de  $8.5 \pm 0.8$  nm para la punta estándar y de  $6.8 \pm 0.7$  nm para la punta ultrafina.

El volumen medio de DNA medido en áreas de  $20 \times 20$  nm obtenido con la punta ultrafina es de  $133 \pm 18$  nm<sup>3</sup>, más pequeño que el obtenido con las puntas convencionales ( $167 \pm 28$  nm<sup>3</sup>).

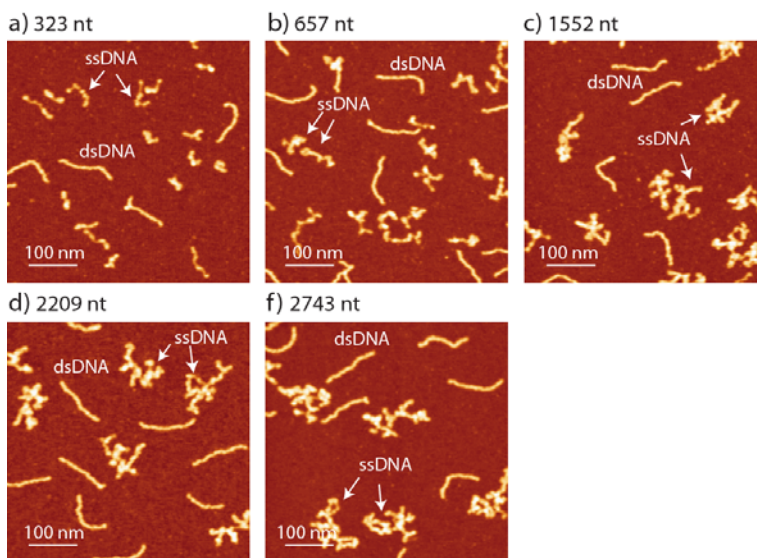


**Figura 3.21. Influencia del tamaño de la punta en el análisis de volumen. a)** Imágenes de moléculas de DNA tomadas con una punta ultrafina (arriba) y una punta estándar (abajo). La escala de color va de oscuros a claros de 0 a 2 nm. **b)** Perfiles de la molécula de DNA indicados en la imagen de AFM correspondiente para cada punta. **c)** La gráfica presenta los volúmenes de proteína normalizados frente al peso molecular de la proteína. Los símbolos coloreados corresponden a los datos tomados con la punta ultrafina y los símbolos en gris corresponden a los datos obtenidos con la punta estándar (también mostrados en la **Figura 3.11**). Cada punto corresponde al valor medio de 100 medidas de volumen de proteína aproximadamente y las barras de error representan la desviación estándar del valor medio.

Para estudiar el efecto del tamaño de la punta sobre el análisis de volumen, se repitieron las medidas de volumen de las proteínas SMC, ScpA y ScpB utilizando la punta ultrafina ( $r < 4$  nm). Los volúmenes de las proteínas fueron normalizados tal y como se hizo en los experimentos con la punta estándar utilizando como referencia moléculas de DNA coadsorbidas con las proteínas. Los nuevos volúmenes normalizados fueron representados frente al peso molecular (símbolos coloreados) junto con los datos obtenidos previamente con la punta estándar (símbolos en gris). Como se observa en la **Figura 3.21 (c)**, ambos datos se superponen perfectamente y se ajustan a la regresión lineal (pendiente  $m = 11.6 \pm 0.4 \times 10^{-3}$  kDa<sup>-1</sup> y ordenada en el origen  $b = 0.06 \pm 0.02$ ). Esto indica que el volumen normalizado es independiente al tamaño de la punta o dicho de otra manera, que nuestra metodología minimiza el efecto de convolución inducido por la punta.

#### 4.7. Aplicación del método de volúmenes a DNA de cadena sencilla

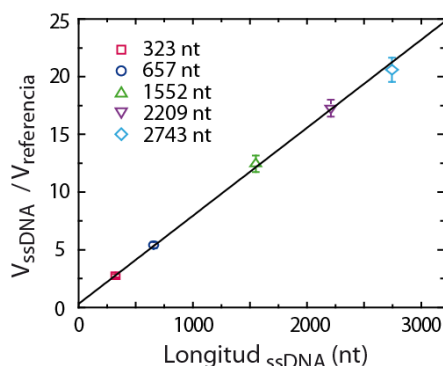
Las moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA) adquieren una estructura secundaria característica que hace que se distingan fácilmente de las moléculas de DNA de cadena doble (dsDNA). Por otra parte y al contrario de lo que ocurre con dsDNA, la adopción de estructuras secundarias en ssDNA hace prácticamente imposible medir la longitud (número de nucleótidos) contenidos en la molécula. En la **Figura 3.22** se observan las moléculas de ssDNA de diferentes tamaños coadsorbidas con las moléculas de dsDNA que utilizaremos como volumen referencia.



**Figura 3.22. Moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA).** Imágenes de AFM de dsDNA (323 bp) coadsorbidas con moléculas de ssDNA de distintas longitudes: **a)** 323 nt, **b)** 657 nt, **c)** 1552 nt, **d)** 2209 nt y **e)** 2743 nt.

Con el fin de relacionar longitudes con volumen decidimos aplicar nuestra nueva metodología a moléculas de ssDNA (Fuentes-Perez, 2013). En primer lugar se determinó la media del volumen de referencia para una imagen (áreas de 20 x 20 nm de dsDNA) y a continuación se normalizó el volumen de cada molécula de ssDNA entre el volumen medio de referencia para esa imagen.

Los volúmenes de las moléculas de ssDNA normalizados se representan frente a su longitud (en nucleótidos) en la **Figura 3.23**. Se observa que los datos se ajustan bien a una regresión lineal con una pendiente  $m = 7.6 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ nt}^{-1}$  y una ordenada en el origen  $b = 0.31 \pm 0.09$ .



**Figura 3.23. Análisis de volumen aplicado a ssDNA.** Dependencia lineal del volumen de ssDNA en función de su longitud en nucleótidos:  $V_{ssDNA}/V_{ref} = 7.6 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ nt}^{-1} \times L_{ssDNA} + 0.31 \pm 0.09$ .

Estos datos demuestran que a pesar de las diferentes estructuras secundarias adoptadas por las moléculas de ssDNA cuando están adsorbidas a la mica, los volúmenes normalizados son similares.

También es posible estimar el volumen teórico de las moléculas de ssDNA para compararlo con los volúmenes experimentales obtenidos a partir de las imágenes de AFM. Para ello, se empleó la **Ecuación 3.6** considerando  $\bar{V}_2$  el volumen parcial específico del ssDNA ( $0.55 \text{ cm}^3 / \text{g}$ ) (Xu, 2010),  $\bar{V}_1$  el volumen específico parcial del agua ( $1 \text{ cm}^3 / \text{g}$ ) y  $\delta$  el factor de hidratación del DNA ( $0.43 \text{ g H}_2\text{O} / \text{g DNA}$ ) (Bastos, 2004). Con estos valores, el volumen experimental que obtenemos está sobreestimado en un factor de 2.4. Esta sobreestimación se debe principalmente al efecto de la dilación, debido a que los volúmenes sin normalizar sí que están afectados por el radio de la punta.

## 5. Discusión de los resultados

En este capítulo hemos descrito una nueva aproximación para medir volúmenes basada en métodos directos a los que hemos incorporado dos nuevas ideas. En primer lugar, hemos introducido el parámetro de la densidad de volumen ruido. Este parámetro permite substraer el volumen de ruido proporcional a cada proteína, de manera que el volumen obtenido es independiente del área seleccionada. Este paso es importante debido a que a pesar de que la superficie de la mica es teóricamente una superficie atómicamente plana, existen regiones de la mica que tienen pequeñas alteraciones topológicas. Nuestra experiencia nos indica que regiones adyacentes en la mica tienen una densidad de volumen de ruido similar, pero debido a que las condiciones de preparación de los experimentos no son homogéneas en toda la superficie, la rugosidad de la superficie puede variar significativamente al barrer distintas zonas. A lo largo del tiempo en el que se toman las imágenes de un experimento las moléculas se deshidratan y su altura disminuye. Lo mismo ocurre con el ruido de fondo, que cambia con el tiempo. Por ello, la introducción del parámetro de la densidad de volumen de ruido nos proporciona una medida más precisa del volumen del objeto de interés.

La segunda idea consistió en utilizar DNA como molécula de referencia para poder comparar los datos en diferentes experimentos. Idealmente, la referencia debe estar igualmente afectada por las condiciones de preparación del experimento y su volumen ha de ser comparable al de las proteínas que se deseen caracterizar. El volumen de referencia se definió como el volumen de DNA contenido en una región de 20 x 20 nm. Este tamaño óptimo de la región se determinó debido a que era suficientemente pequeño para evitar que la molécula de DNA se curve y suficientemente grande para que la molécula entre en ella.

Utilizando la normalización del volumen de las proteínas con el volumen de DNA se comprobó que los volúmenes obtenidos a partir de imágenes tomadas en diferentes experimentos, con distintas puntas y en distintos días, resultaron comparables entre sí.

El análisis de volumen se ha aplicado a las proteínas que forman el complejo SMC obteniendo información del estado oligomérico: la proteína ScpA es un monómero estable en solución, mientras que las proteínas SMC y ScpB forman dímeros. El estudio de la estabilidad de proteínas reveló que mientras el dímero de SMC es estable en el tiempo, la proteína ScpB favorece la aparición de monómeros. Los experimentos de ultracentrifugación analítica (UAC) mostraron que ScpB es un dímero estable a concentraciones de  $\sim 10 \mu\text{M}$ . Sin embargo, en los experimentos de AFM la población observada era mayoritariamente monómeros ( $\sim 75\%$ ). Esto indica que la constante de disociación de la proteína debe de estar en el rango de 100 nM.

Los volúmenes obtenidos a partir de imágenes de AFM fueron proporcionales al peso molecular de las proteínas. Además, se ha observado que el cálculo



lo del volumen no depende de la forma del objeto. El dímero de SMC y la proteína AddAB tienen un peso molecular parecido (271 y 276 kDa, respectivamente) pero poseen estructuras diferentes (la primera con una estructura más flexible y alargada y la segunda más compacta y alta). Sin embargo, el volumen obtenido para las dos proteínas se ajusta perfectamente a la misma regresión lineal. Por lo tanto, a partir de estos resultados se puede decir que el volumen no se ve afectado por los diferentes cambios conformacionales que las proteínas adopten en la mica, al menos, en el rango de tamaños de proteínas empleados en este trabajo.

También se ha estudiado la dependencia del volumen con el radio de la punta empleada para obtener las imágenes. Nuestros resultados indican que el volumen normalizado es independiente del tamaño de la punta. Esta conclusión nos hace reflexionar sobre el efecto de convolución entre la punta y la muestra, de manera que, aunque la dilación no se elimina al calcular el volumen, su efecto se ve contrarrestado al dividir dos volúmenes que se ven afectados de la misma forma.

La distribución de los volúmenes obtenida empleando la aproximación que proponemos tiene un error relativo de un 6-10%, la mitad de lo obtenido en trabajos previos. Esta reducción en la desviación de los datos se debe principalmente al método empleado para medir volúmenes. El método que hemos desarrollado requiere de un análisis semi-manual, en el que el usuario debe seleccionar el área para cada proteína, substrayendo el volumen de ruido proporcional en cada caso. Sin embargo, otros métodos más automáticos calculan el volumen total de un área y después lo dividen entre el número total de elementos. Estos métodos son más rápidos pero sufren de un error mayor. La inducción de una referencia coadsorbida con la muestra resulta fundamental para poder comparar datos entre distintos días, distintas puntas, e incluso dentro del mismo experimento pero zonas distintas.

El análisis de volumen también se ha empleado para obtener información de las interacciones entre las proteínas del complejo de SMC. Se ha observado que la proteína ScpA interacciona con SMC, mientras que la proteína ScpB sólo interacciona con SMC en presencia de ScpA. Por lo tanto, mediante estos experimentos somos capaces de reproducir *in vitro* el complejo SMC con todos sus componentes. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos bioquímicos de filtración en gel realizados por nuestros colaboradores y con la estequiometría aceptada para las proteínas del complejo (Bürmann, 2013).

Por otra parte, las dos proteínas suplementarias también interaccionan entre sí formando complejos de mayor tamaño. Los experimentos de AFM sugieren una interacción de ScpA-ScpB<sub>2</sub>, aunque también se observan complejos de mayor tamaño con menor frecuencia. En el artículo (Woo, 2009) estudian el análogo de SMC en *E.coli*, el complejo MukBEF, y observan interacciones entre las proteínas suplementarias en una relación MukE<sub>4</sub>F<sub>2</sub>, es decir, el doble de lo que observamos en nuestros experimentos. A pesar de las diferencias estructurales entre ambas proteínas, una explicación puede ser que debido a

que la constante de disociación de ScpB favorece el estado monomérico a las concentraciones en las que se trabaja con el AFM, impidiera la formación de complejos mayores.

Cuando las tres proteínas se incuban juntas en la reacción, la resolución del análisis de volumen no permite distinguir entre complejos  $SMC_2$ -ScpA-ScpB<sub>2</sub> y  $SMC_2$ -ScpA<sub>2</sub>-ScpB<sub>4</sub>. El volumen experimental obtenido está entre el volumen teórico de los dos complejos:  $SMC_2$ -ScpA-ScpB<sub>2</sub> y  $SMC_2$ -ScpA<sub>2</sub>-ScpB<sub>4</sub>. También se ha observado que la proteína SMC forma estructuras de mayor tamaño que hemos definido como multímeros y agregados. Mientras que los agregados empiezan a estar presentes al introducir una única proteína suplementaria en la reacción con SMC, los multímeros se forman exclusivamente cuando las tres proteínas están en la reacción. Esto sugiere que las proteínas ScpA y ScpB están implicadas en la multimerización de SMC, favoreciendo la interacción de éstas por sus dominios cabeza. Además, dado que la hidrólisis de ATP se lleva a cabo por el dominio cabeza de las proteínas SMC, las proteínas suplementarias podrían desempeñar una función importante como agentes reguladores.

El análisis de volumen también se ha aplicado con éxito a moléculas de ssDNA. Se ha obtenido una relación lineal entre el volumen y la longitud en nucleótidos de estas moléculas. Además, se ha visto que las distintas estructuras secundarias adoptadas por las moléculas no afectan al volumen obtenido, de la misma manera que ocurre con las proteínas. La caracterización de moléculas de DNA de cadena sencilla es importante ya que permite estudiar moléculas de ssDNA formadas como productos secundarios de reacciones.

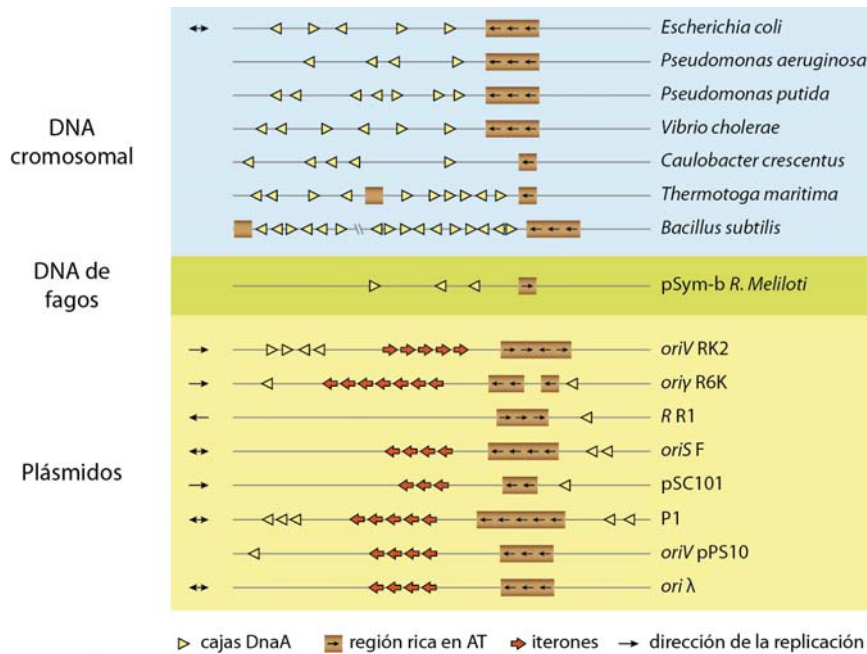
# 4. Proteínas Iniciadoras de la Replicación Caracterizadas por AFM

## 1. Introducción

La replicación del DNA es un mecanismo que permite duplicar la información genética en el proceso de la división celular. Este proceso es fundamental para la conservación del material genético entre generaciones sucesivas de células y se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. En la etapa de iniciación, las proteínas encargadas de la iniciación de la replicación, OBP (por sus siglas en inglés *Origin Binding Proteins*), desestabilizan la doble hélice del DNA formando la burbuja de replicación y facilitando que la helicasa comience a abrir la doble hebra del DNA. En la etapa de elongación la polimerasa es la encargada de ir añadiendo nucleótidos sobre el molde de DNA de cadena sencilla que previamente le ha facilitado la helicasa. Este proceso termina cuando la polimerasa reconoce la secuencia de terminación, finalizando así el proceso de la replicación. En este trabajo nos hemos centrado en la etapa de iniciación, que explicaremos a continuación con más detalle.

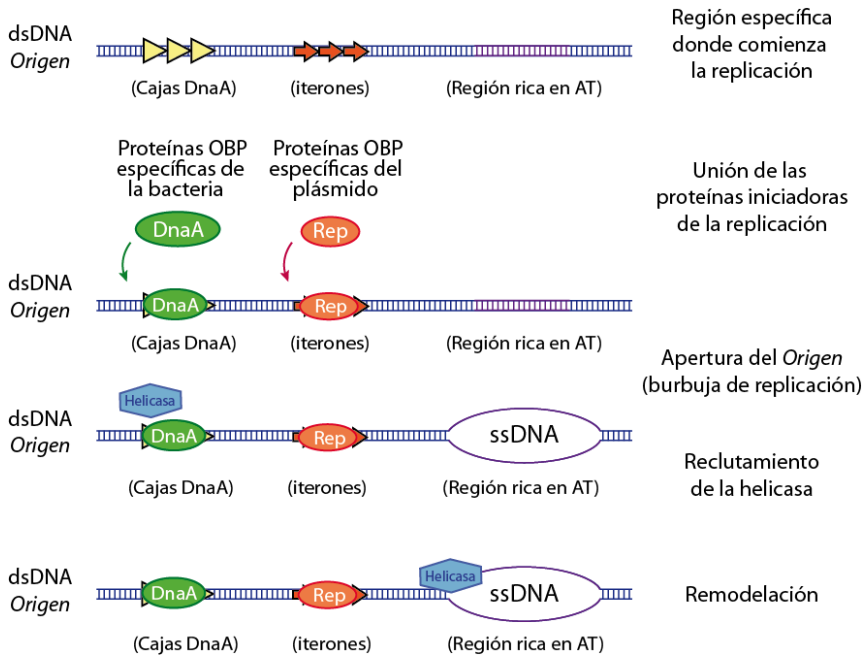
La replicación comienza en una región específica del DNA llamada *origen*. Como se puede ver en la **Figura 4.1**, el DNA cromosomal, el de fagos y el de plásmidos, comparten unos elementos comunes: todos tienen una región rica en ATs (adeninas y timinas), la mayor parte de ellos tienen cajas DnaA, y tan solo los plásmidos tienen iterones. Esta región específica está bien definida

para bacterias (Rajewska, 2012), pero sin embargo de las proteínas OBP sigue sin entenderse en su totalidad.



**Figura 4.1. Orígenes de replicación en DNA cromosomal, DNA de fagos y plásmidos de algunas especies seleccionadas.** Todos los orígenes contienen una región rica en AT (representada por flechas negras), casi todas tienen cajas de DnaA (representado por triángulos amarillos) y únicamente los plásmidos tienen iterones (flechas rojas). Esquema adaptado de (Rajewska, 2012).

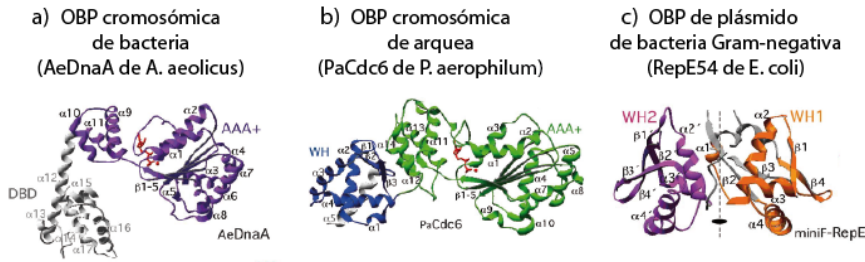
Existen dos tipos de proteínas OBP en plásmidos: las que son específicas de la bacteria, que se llaman genéricamente proteínas DnaA y se unen a las cajas de DnaA, y las que son específicas del plásmido, que se llaman genéricamente proteínas *Rep* y se unen a los iterones. Ambas proteínas una vez que están unidas a la región específica del *origen* y junto con otros componentes, desestabilizan la doble hélice del DNA en la región rica en ATs, formando la burbuja de replicación. Entonces, la proteína DnaA recluta la helicasa, la cual se desplazará hasta la burbuja de replicación. La helicasa comienza a abrir la doble hélice para facilitar el sustrato a la polimerasa (ver **Figura 4.2** para más detalle).



**Figura 4.2. Esquema del proceso de iniciación de la replicación en plásmidos.**

La replicación comienza en el *Origen*, una región específica que está formada generalmente por Cajas de DnaA (donde se unen las OBP específicas de la bacteria, proteínas DnaA) y por iterones (donde se unen las OBP específicas del plásmido, proteínas Rep). Las OBP junto con otros componentes, desencadenan la apertura de las dos hebras de DNA en la región rica en ATs, formando la burbuja de replicación. Entonces, la proteína DnaA recluta a la helicasa y se produce una re-estructuración del sistema (remodelación) donde la helicasa se mueve a la burbuja de replicación para comenzar a abrir el DNA. El último paso (no mostrado) sería la llegada de la polimerasa a la burbuja de replicación, comenzando la etapa de elongación.

Estudios recientes han mostrado que las proteínas DnaA cromosómicas se unen al DNA de cadena sencilla cercano a la región de las cajas de DnaA formando una estructura helicoidal y, que además, interaccionan con el DNA de la región rica en ATs (Duderstadt, 2011). Estas proteínas DnaA se caracterizan por tener un dominio DBD (por sus siglas en inglés, *DNA Binding Domain*) y otro AAA+ para la unión de ATP (ver **Figura 4.3 (a y b)**). Las proteínas Rep son estructuralmente diferentes. Están formadas por dos dominios WH (por sus siglas, *Winged Helix*) y hasta la fecha, no se ha descrito ninguna interacción con la región rica en ATs (**Figura 4.3 (c)**).



**Figura 4.3. Estructura de proteínas OBP:** a) proteína cromosómica de bacteria (AeDnaA de *A. aeolicus*), b) proteína cromosómica de arquea (PaCdc6 de *P. aerophilum*) y c) proteína del plásmido mini-F de bacteria Gram-negativa (ReE54 de *E. coli*). Estructura adaptada de (Giraldo, 2003a).

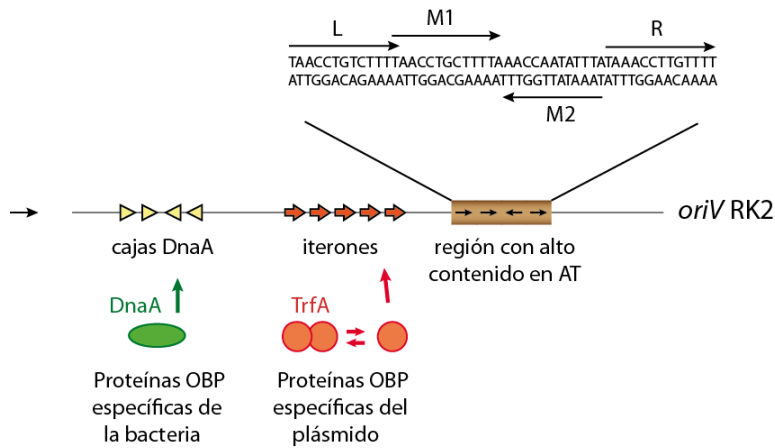
En este trabajo nos vamos a centrar en dos propiedades de las proteínas *Rep*:

- 1) La función de las proteínas *Rep* como proteínas iniciadoras de la replicación: para ello tomaremos como modelos la proteína TrfA del plásmido RK2 y la proteína RepE del plásmido F. Este proyecto se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Igor Konieczny y su postdoc Dr. Katarzyna Wegrzyn de la Universidad de Gdansk (Polonia).
- 2) La función de las proteínas *Rep* como modelos de estructuras amiloides: para ellos utilizaremos la proteína RepA. Este proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Rafael Giraldo (CIB-CSIC, Madrid) y el Dr. Oscar Llorca (CIB-CSIC, Madrid)

### 1.1. Iniciación de la replicación en el plásmido RK2

Como sistema modelo para estudiar la iniciación de la replicación se eligió el plásmido RK2. El plásmido RK2 puede replicarse en una amplia gama de huéspedes, entre los que encuentran todas las bacterias gram-negativas y la mayor parte de bacterias gram-positivas estudiadas (Kolotka, 2010). Es un plásmido con una longitud de 60 kbp, que tiene un contenido de GC del 62% y que codifica al menos 74 genes, entre los que se encuentra el gen para TrfA, que es la proteína *Rep* en el plásmido RK2.

El origen en el plásmido RK2 se conoce como *OriV* y está formado por: cuatro cajas de DnaA, donde se une la proteína DnaA; cinco iterones, donde se une TrfA; y una región rica en AT (ver **Figura 4.4**). La región rica en AT está formada por cuatro repeticiones de trece bases (conocida como *13-meros*) que se encuentra bien conservada (TAAncntntTTt) (Kowalczyk, 2005). Dichas repeticiones se conocen como L, M1, M2 y R, por sus iniciales en inglés de *Left*, *Middle 1*, *Middle 2* y *Right*. Tres de ellas (L, M1 y R) están colocados en el sentido directo de la replicación y una de ellas (M2) en el sentido opuesto a la replicación. Estudios previos han demostrado que tanto la secuencia de esta región rica en AT, como la dirección y el espaciado entre los *13-meros* es importante para que el origen de la replicación sea activo (Kowalczyk, 2005).



**Figura 4.4. Detalle del origen (*OriV*) en el plásmido RK2.** *OriV* está formado por cuatro cajas de DnaA (donde se une la proteína DnaA), cinco iterones (donde se une la proteína TrfA en forma monomérica) y una región rica en AT, formada por cuatro repeticiones de trece bases (*13-mers*). La proteína TrfA es estable como dímero en solución, pero sin embargo, sólo es activa para unirse a los iterones como monómero.

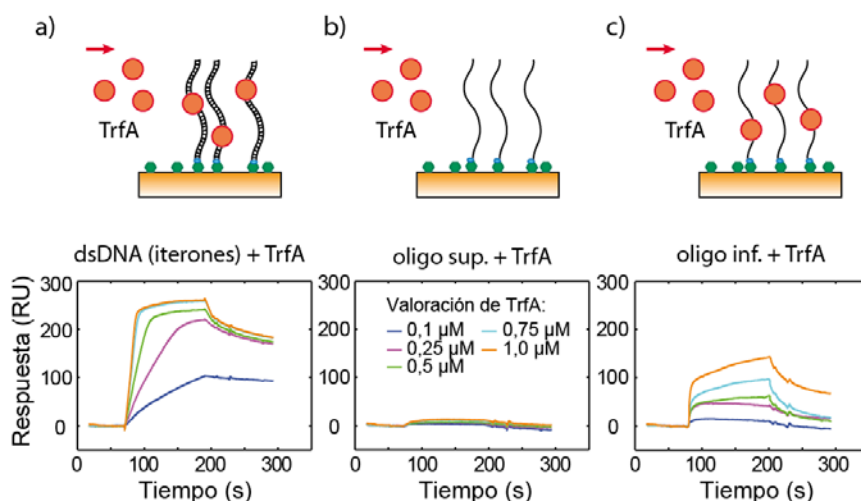
La proteína TrfA aparece en un bajo número de copias en la bacteria, por ejemplo, en bacterias *E. coli* que tengan el plásmido RK2 este número se ha estimado en torno a 220 proteínas (Kolotka, 2010). En su forma estable *in vivo* TrfA es un dímero pero, sin embargo, sólo en su forma monomérica se une a los iterones (Toukdarian, 1996). Esta activación se realiza en presencia de la chaperona ClpX de *E. coli*, o como efecto cooperativo de las chaperonas ClpB, DnaK, DnaJ y GrpE de *E. coli* (Kolotka, 2010).

### 1.1.1. Experimentos de SPR

El trabajo inicial de nuestros colaboradores usando la técnica de Resonancia Superficial Plasmonica (SPR por sus siglas en inglés, *Surface Plasmon Resonance*) demostró la interacción de TrfA con DNA. Esta técnica se basa en la oscilación colectiva de los electrones de un metal al ser excitados por un haz incidente de luz. Cuando la frecuencia de los fotones incidentes coincide con la frecuencia natural de oscilación de los electrones de superficie del metal, éstos entran en resonancia. Esta frecuencia de resonancia varía en función del material adsorbido en la superficie del metal y por tanto la señal de resonancia obtenida proporciona una medida de la masa en la superficie.

El experimento de SPR realizado por nuestros colaboradores consistió en lo siguiente: primero se inmovilizó en la superficie del sensor una molécula de DNA de 128 bp de longitud que contiene la secuencia de los iterones y a continuación se introdujo la proteína TrfA (**Figura 4.5 (a)**). Se observó que para concentraciones crecientes de proteína (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1  $\mu$ M), la respuesta del sensor aumenta, lo que se interpreta como una interacción entre el DNA que contiene la secuencia de los iterones y la proteína TrfA. A conti-

nuación se inmovilizaron oligos (DNA de cadena sencilla) de 70 bp con la secuencia de la hebra superior o hebra inferior de la región rica en AT. Se observó que TrfA interactuaba únicamente con el oligo que contenía la secuencia de la hebra inferior de la región rica en AT (**Figura 4.5 (c)**), mientras que no interactuaba con el oligo que contenía la secuencia de la hebra superior de la región rica en AT (**Figura 4.5 (b)**) (Wegrzyn, 2014).



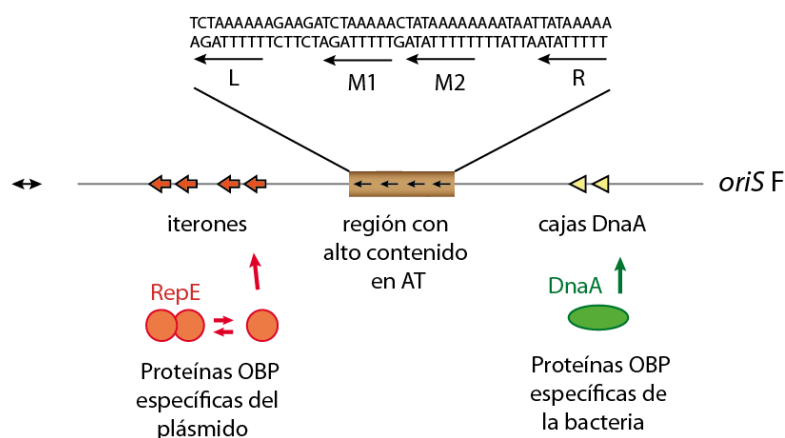
**Figura 4.5. Interacción específica de TrfA en la región de los iterones y a un oligo que contiene la secuencia de la hebra inferior de la región rica en AT.** Representación gráfica (panel superior) y gráficas experimentales de los experimentos de SPR (panel inferior). **a)** La proteína TrfA se une a los iterones (dsDNA), **b)** la proteína TrfA no se une al oligo que contiene la secuencia de la hebra superior de la región rica en AT y **c)** mientras que se une al oligo que contiene la secuencia de la hebra inferior de la región rica en AT. Los experimentos de SPR han sido realizados por el grupo del Dr. Igor Konieczny.

Esta técnica permite cuantificar interacciones entre dos elementos, el que se adsorbe en la superficie y el que se fluye. Sin embargo, no se puede estudiar interacciones entre más de dos elementos puesto que los dos elementos que se fluyen en la celda competirían entre sí y la respuesta observada por el aparato sería una mezcla de todas las interacciones producidas en la celda de reacción.

## 1.2. Iniciación de la replicación en el plásmido F

El origen en el plásmido F se conoce como *OriS* y está formado por: dos cajas DnaA, donde se une la proteína DnaA; cuatro iterones, donde se une TrfA; y una región rica en ATs (ver **Figura 4.6**). La región rica en ATs está bien conservada y está formada por cuatro repeticiones de ocho bases orientadas en la misma dirección con la secuencia TTTTAnA.

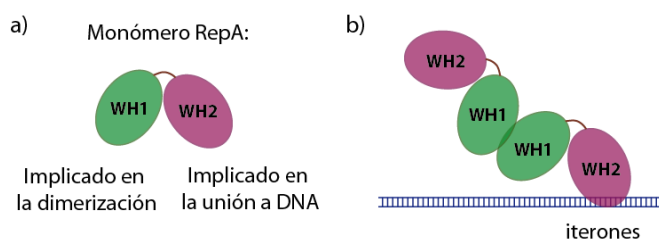




**Figura 4.6. Detalle del origen (*OriS*) en el plásmido F.** *OriS* está formado por dos cajas DnaA (donde se une la proteína DnaA), cuatro iterones (donde se une la proteína RepE en forma monomérica) y una región rica en AT, formada por cuatro repeticiones de ocho bases. La proteína RepE es un dímero en solución, pero sin embargo, sólo en su forma monomérica es activa para unirse a los iterones.

### 1.3. Proteínas *Rep* como modelo de estructuras amiloides

La caracterización de estructuras amiloides es importante debido a las implicaciones que tienen estas estructuras en enfermedades degenerativas, como por ejemplo el Alzheimer, así como por su implicación en factores epigenéticos.



**Figura 4.7. Proteína RepA.** a) Esquema de la estructura del monómero de la proteína RepA. b) Esquema de la proteína RepA interaccionando con el dominio WH2 con el DNA y con el dominio WH1 con otra proteína RepA formando un dímero. Modelo adaptado de (Díaz-Lopez, 2006). Una vez que el dímero de RepA interacciona con el DNA, se disocia en monómeros (no mostrado en el esquema).

La estructura de la proteína RepA es muy parecida a la estructura de la proteína RepE mostrada en la **Figura 4.3 (c)**. La estructura ha sido obtenida mediante difracción de rayos X por (Giraldo, 2003b) y está formada por dos dominios WH: el dominio WH1 (situado en el amino terminal) está implicado en la dimerización de la proteína y el WH2 (situado en el carboxilo terminal) está implicado en la unión de DNA a los iterones (**Figura 4.7**). La proteína

RepA es específica del plásmido pPS10 de *Pseudomonas* cuyo origen de replicación se llama *OriV* (**Figura 4.1**).

Curiosamente, el dominio WH1 de la proteína RepA forma estructuras fibrilares con estructura amiloide y este hecho convierte a RepA en un buen modelo para estudiar agregación amiloide. Los agregados amiloides de proteínas están implicados en enfermedades neurodegenerativas y por eso son de gran interés en la comunidad científica. Sin embargo, las estructuras fibrilares son polimórficas y resulta difícil obtener información estructural. A pesar de ello, se ha obtenido la estructura de varias de ellas mediante cristalografía (Ivanova, 2009), resonancia magnética nuclear (Lu, 2013) y microscopía electrónica (Arranz, 2012). En este trabajo, vamos a utilizar la proteína RepA como modelo para estudiar estructuras amiloides y caracterizarlas mediante AFM.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Purificación de las proteínas *Rep*, TrfA, RepE y RepA

**Proteínas TrfA y RepE:** Ambas proteínas han sido purificadas por el grupo del Prof. Konieczny. La proteína TrfA se ha purificado con una mutación en los aminoácidos implicados en la dimerización, proteína TrfA G254D/S267L (llamado D/L a partir de ahora), por lo que la proteína TrfA D/L es un monómero estable en solución. También han purificado la proteína RepE con una mutación puntual (R118P) que le hace estable como monómero. Estos mutantes son monómeros activos que se unen a los iterones. Los detalles de la purificación se pueden encontrar en los artículos (Blasina, 1996) y (Matsunaga, 1997).

Los fragmentos lineales de DNA para AFM se han preparado por digestión con enzimas de restricción del plásmido previamente crecido en bacterias. En el caso del fragmento que contiene el origen *OriV*, el plásmido pKD19L1 se incubó con la enzima de restricción *PstI* para obtener un fragmento lineal de 1615 bp. En el caso del fragmento que contiene el origen *OriS*, el plásmido pZZ38 se incubó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para obtener un fragmento lineal de 1132 bp. Ambos fragmentos lineales fueron extraídos de la banda correspondiente de un gel de agarosa (0,7%) y purificados usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (Quiagen). Los oligos fueron encargados a la compañía *Thermo Scientific*.

La **proteína RepA** fue purificada y ensamblada por el grupo del Prof. Rafael Giraldo. La proteína RepA se ha purificado con una mutación puntual del aminoácido A31V en el dominio WH1 que permite que el plásmido pPS10 se pueda replicar y mantener en una gran variedad de bacterias huésped (Giraldo, 2004). La concentración de la muestra una vez ensamblada formando fibras fue de 25  $\mu$ M de RepA-WH1 (A31V) en tampón (40 mM Hepes pH 8.0, 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7% PEG4000, 3% MPD).

### 2.2. Preparación de las muestras para AFM

Para los experimentos de interacción entre TrfA y RepE con DNA se preparó una muestra en un volumen final de 20  $\mu$ l en el tampón de reacción compuesto por 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 11 mM MgCl<sub>2</sub> y 4 mM de DTT, incluyendo 225 nM de la proteína correspondiente (TrfA D/L o RepE R118P) y 1-2 nM del DNA correspondiente. La reacción fue incubada a 32°C durante 10 minutos. En los experimentos donde fuese necesario incluir un oligo, se añadió a la reacción al finalizar los 10 minutos y se incubó durante otros 10 minutos más a la misma temperatura. Después, se depositó en la mica recién exfoliada durante unos 30 segundos, se lavó con agua MilliQ y se secó con un chorro de nitrógeno gaseoso. La proteína TrfA es una proteína muy sensible y en cada purificación se obtienen proteínas que son más o menos activas. Aquellas que son muy activas, tienden a agregar en condiciones de baja sal. Por lo tan-

to, los experimentos realizados con la segunda purificación de TrfA, la más activa, se añadió NaCl hasta una concentración final de 100 mM. Ambas preparaciones de TrfA proporcionaron resultados similares.

Para depositar las fibras de RepA en la mica, se diluyó la muestra 1:3 en agua en un volumen final de 3  $\mu$ l y se depositó sobre la mica previamente tratada con poly-l-lysina (Sigma). El pretratamiento consistió en depositar 20  $\mu$ l de la solución al 0.01% de poly-l-lysina sobre la mica previamente exfoliada. Después de unos segundos la mica se lavó con un chorro de agua abundante y se secó con nitrógeno gas. Sobre la mica pretratada se añadieron los 3  $\mu$ l de la muestra durante 1 minuto y se lavó con 3 ml de agua Milli-Q y secó con nitrógeno gas.

### 2.3. Condiciones de medida con el AFM

Las imágenes se tomaron con el AFM de Nanotec (Nanotec Electrónica, Madrid) descrito en la Sección 8 del Capítulo 1. El modo de medida utilizado es el modo dinámico con modulación en amplitud (*tapping*) con una amplitud pequeña de 5 nm para evitar dañar la muestra. La frecuencia de barrido utilizada fue de 0.5-2 líneas/s con 512 puntos. Las imágenes se tomaron en aire, a temperatura ambiente (25°C) y con 30% de humedad. Las puntas utilizadas fueron el modelo PPP-NCH (PointProbePlus) de Nanosensors (Suiza). Ver **Tabla 1.1** para más detalle.

### 3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue estudiar el complejo de replicación formado por proteínas *Rep* y DNA y caracterizar las fibras amiloides formadas por la proteína RepA mediante la microscopía de fuerzas atómicas.

Para ello propusimos los siguientes objetivos específicos.

1. Caracterizar la unión de TrfA y RepE, proteínas iniciadoras de la replicación específicas del plásmido RK2 y F respectivamente, a la región específica del origen conocida como iterones.
2. Averiguar si es posible que las proteínas TrfA y RepE se unan a la región rica en ATs cuando a su vez están unidas a los iterones, y comprobar si esta unión es específica de la secuencia tal y como ocurre en los experimentos de SPR.
3. Proponer un modelo para el mecanismo de las proteínas *Rep*, como proteínas iniciadoras de la replicación.
4. Caracterizar estructuralmente las fibras amiloides formadas por la proteína RepA-WH1 (A31V).

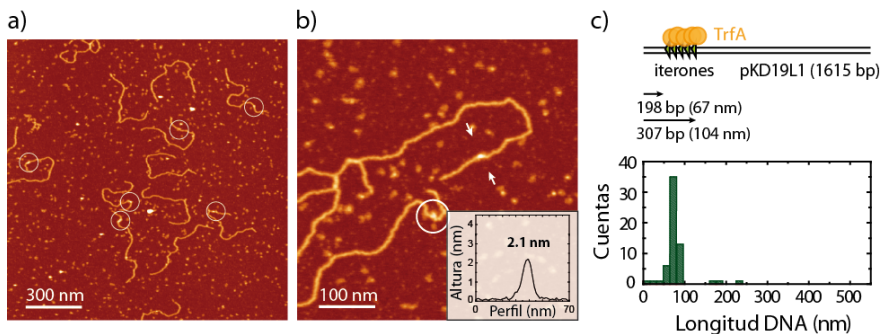
## 4. Resultados experimentales

### 4.1. Proteína TrfA

En esta sección se va a estudiar la interacción de la proteína TrfA con una molécula de DNA que contiene la secuencia de los iterones y posteriormente introduciendo un oligo que contiene la secuencia de la región rica en ATs. Para caracterizar dichas interacciones se han tomado imágenes de AFM y se ha utilizado dos métodos distintos: caracterización de la altura de los complejos y análisis de volumen.

#### 4.1.1. Unión de TrfA a los iterones

El primer paso es estudiar la interacción de la proteína TrfA con la región de los iterones. Los cinco iterones que forman el *OriV* están situados entre los primeros 67 y 104 nm de uno de los extremos de las moléculas de DNA. A partir de las imágenes de AFM es imposible diferenciar entre los dos extremos de las moléculas lineales. Sin embargo, dado que la posición de los iterones se encuentra en una posición específica y asimétrica del centro, podremos atribuir la interacción de la proteína en la posición de los iterones cuando observemos un complejo en dicha posición.



**Figura 4.8. Interacción de TrfA con el DNA en la región de los iterones. a) y b)** imágenes de AFM de distintas ampliaciones donde se muestran los complejos DNA:TrfA con círculos. El inicio y final del perfil en **b)** se indica con flechas blancas. **c)** Esquema de la posición de los iterones en el fragmento lineal de DNA (parte superior) e histograma de posiciones de la interacción DNA:TrfA (parte inferior).

En la **Figura 4.8 (a y b)** se observan las moléculas de DNA de 1615 bp incubadas junto con la proteína TrfA. En un 23% de las moléculas de DNA aparece un punto más brillante cercano a uno de los extremos. La posición de ese complejo se ha medido utilizando el programa WSxM y corresponde con la posición de los iterones. El histograma de la **Figura 4.8 (c)** recoge la posición de 60 complejos DNA:TrfA y algunos ejemplos se muestran con círculos en las imágenes de AFM. También se ha caracterizado la altura media de los

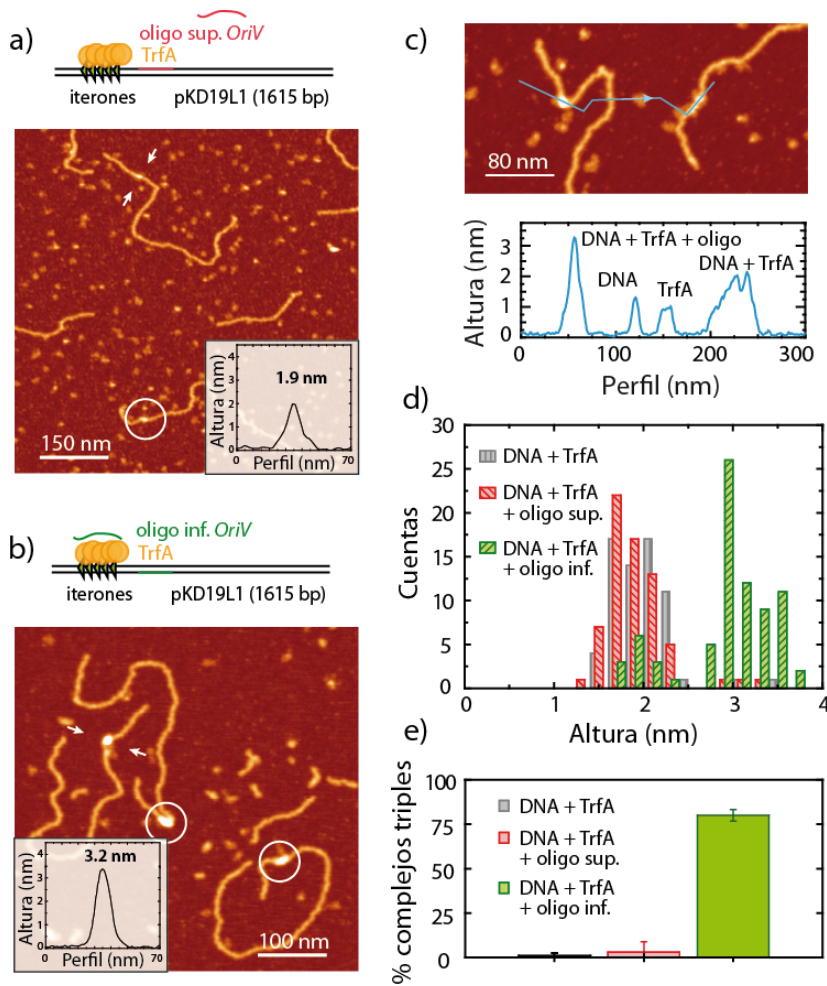
complejos dobles obteniendo un valor de  $1.9 \pm 0.4$  nm, equivalente al doble de la altura típica de una molécula de DNA en aire (Moreno-Herrero, 2003). Un ejemplo de un perfil de alturas se puede ver en la gráfica de la **Figura 4.8 (b)** medido entre las dos flechas de la imagen.

#### 4.1.2. Unión de TrfA a los iterones y a la región rica en AT simultáneamente: caracterización de alturas

Uno de los modelos que explican la función de estas proteínas se basa en la inducción de un torque para desestabilizar la región rica en ATs. Dado que el fragmento de DNA que se utiliza en los experimentos de AFM es una molécula lineal, en caso de producirse dicho torque, la molécula se relajaría inmediatamente. Por lo tanto es imposible que se genere la burbuja de replicación y con ello una interacción específica entre una de las dos hebras de la región rica en ATs con la proteína TrfA.

Un experimento alternativo para estudiar si TrfA puede interaccionar simultáneamente con los iterones y con la región rica en AT, es la introducción de un oligo de 70 nt con la secuencia de la hebra superior (oligo sup.) o de la hebra inferior (oligo inf.) de la región rica en ATs a la reacción de DNA:TrfA. En la **Figura 4.9 (a y b)** se muestran imágenes representativas de la reacción DNA:TrfA:oligo sup. e inf., respectivamente. En ambos casos se observan complejos situados en la posición de los iterones. Pero si se analizan las alturas características de estos complejos, en el caso del oligo sup. la altura del complejo es de  $1.8 \pm 0.6$  nm, mientras que en el caso del oligo inf. la altura del complejo es de  $2.9 \pm 0.4$  nm. En el primer caso (oligo sup.) la altura obtenida es idéntica a la altura del complejo DNA:TrfA obtenida sin la presencia de oligo, mientras que en el segundo caso (oligo inf.) la altura ha aumentado 1 nm. Esta diferencia de alturas nos permite distinguir entre complejos dobles DNA:TrfA con una altura de 2 nm aprox. y complejos triples DNA:TrfA:oligo con una altura de 3 nm aprox. (**Figura 4.9 (c)**).

Aplicando este criterio de alturas para distinguir entre complejos dobles (DNA:TrfA) y complejos triples (DNA:TrfA:oligo) podemos contar el número de moléculas que han incorporado el oligo. Se obtiene que el porcentaje de complejos triples observados en el caso del oligo sup. es del 2%, frente al 80% de complejos triples observados con el oligo inf. (**Figura 4.9 (d y e)**). Por lo tanto, podemos concluir que la secuencia es importante para que produzca la interacción entre la proteína TrfA y la región rica en ATs.



**Figura 4.9. Formación del complejo triple DNA:TrfA:oligo.** **a)** y **b)** Imágenes de AFM del experimento con los tres componentes: DNA:TrfA:oligo sup. y oligo inf. El oligo contiene la secuencia de la hebra superior e inferior de la región rica en ATs respectivamente. Las flechas blancas indican el principio y final del perfil de altura mostrado en la gráfica. Los círculos indican complejos representativos como los que se muestran en el perfil de alturas. **c)** Perfil de altura donde se observan las diferencias entre un complejo triple (altura 3 nm aprox.) y un complejo doble (altura 2 nm aprox.). **d)** Histograma de alturas de los tres experimentos: DNA:TrfA, DNA:TrfA:oligo sup. y DNA:TrfA:oligo inf. **e)** Porcentaje de complejos triples observados en los tres experimentos.

También se realizó el experimento control sin TrfA, con DNA y el oligo inf., y no se observaron complejos triples (imágenes no mostradas, ver material suplementario (Wegrzyn, 2014)).



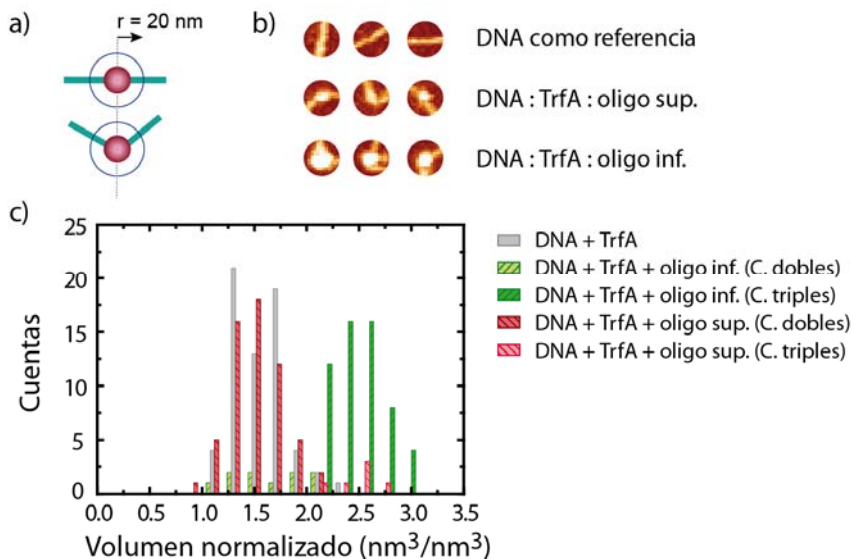
#### 4.1.3. Estudio de la formación del complejo triple DNA:TrfA:oligo mediante el análisis de volúmenes

El análisis de volumen ha sido aplicado con éxito por otros grupos de investigación para estudiar la interacción entre DNA y proteínas (Wyman, 1997) (Verhoeven, 2002) (Beerens, 2005). Por esto mismo, decidimos aplicar el método de volúmenes descrito en el Capítulo 3 para caracterizar la unión de las proteínas iniciadoras de la replicación al DNA.

Las imágenes se tomaron con menor resolución que en el Capítulo 3 (2.93 nm/píxel). En este caso, se eligió un área circular de 20 nm de radio como ventana para medir tanto el volumen de referencia de DNA, como el volumen de la interacción DNA:proteína:oligo (cuando fuera necesario). La elección de un área circular se realizó con el fin de tener la misma contribución del volumen de DNA en la región de referencia, tal y como se muestra en la **Figura 4.10 (a)**. Además, debido a la menor resolución de las imágenes, la elección de una ventana cuadrada de 20 nm de lado como volumen de referencia implicaba tomar muy pocos datos (únicamente 7 píxeles de lado).

En la **Figura 4.10 (c)** se muestran los volúmenes normalizados para los tres experimentos: DNA:TrfA (gris), DNA:TrfA:oligo superior (rojo) y DNA:TrfA y oligo inferior (verde), y en la **Figura 4.10 (b)** se incluyen tres ejemplos representativos de cada caso. Se observa que en el caso de tener los tres componentes con el oligo con la secuencia inferior los complejos obtenidos tienen un volumen mayor que en los otros dos casos. Estos resultados confirman los resultados obtenidos mediante el análisis de alturas.

La dispersión de los volúmenes es mayor si lo comparamos con los datos obtenidos en el Capítulo 3. Obtenemos un error relativo del 20% en el caso de los complejos dobles y del 12% en el caso de los complejos triples. Esta dispersión mayor, intrínseca de los datos, indica que hay una variación en el número de proteínas unidas al DNA. Como se verá en la Sección 4.2.1 con la proteína RepE, no siempre los iterones están ocupados por proteína. Por lo tanto, se puede dar el caso de que sólo una proteína esté unida a un iteron y así hasta completar los cinco iterones del *OriV*.



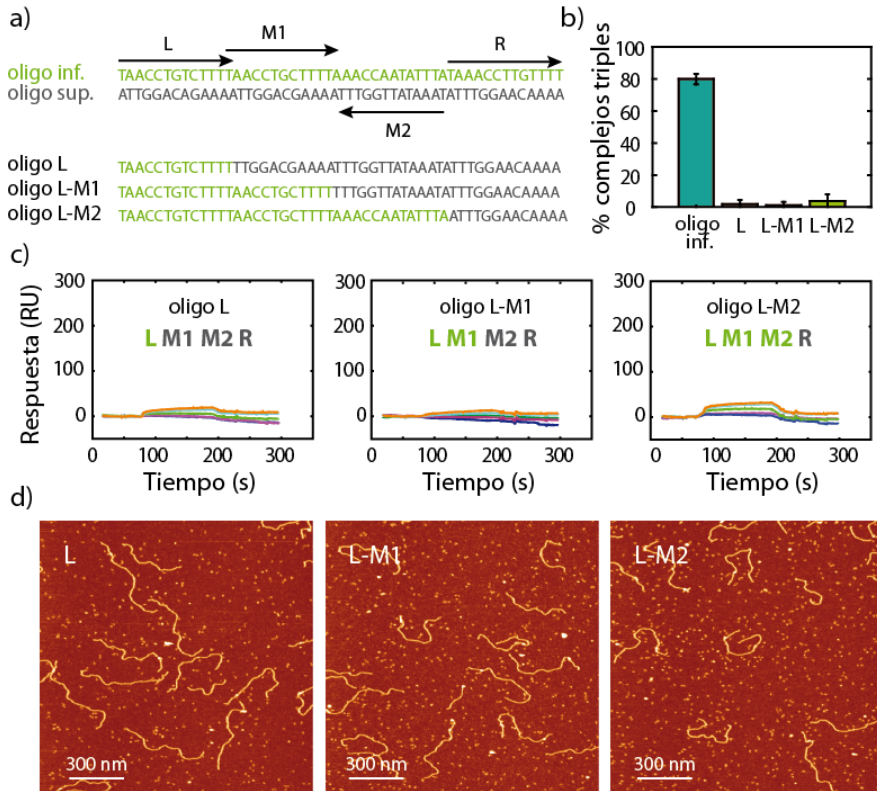
**Figura 4.10. Análisis de volumen de la proteína iniciadora de la replicación TrfA.** a) Ilustración del método para obtener el volumen con un área circular de 20 nm de radio. La ventana circular se centra siempre en el complejo. b) Tres ejemplos representativos de cada uno de los casos: DNA como referencia, complejo doble DNA:TrfA y complejo triple DNA:TrfA:ssDNA superior. c) Histograma de volúmenes para los tres experimentos: DNA:TrfA (datos en gris), DNA:TrfA:oligo inferior (datos en verde) y DNA:TrfA:oligo superior (datos en rojo).

Cabe destacar que la dispersión de los volúmenes de referencia es mayor si lo comparamos con los datos del capítulo anterior. Como ya se analizó en la Sección 4.6.1 del Capítulo 3, un área mayor implica una dispersión mayor de los datos. Como en este caso la ventana es un círculo de 20 nm de radio (casi el doble de la ventana elegida en el capítulo anterior) la desviación de los datos es del 20%.

#### 4.1.4. Necesidad de los cuatro 13-meros para que se produzca el complejo ternario

Hasta ahora hemos comprobado que la secuencia de la región rica en ATs es importante para que se produzca el complejo triple DNA:TrfA:oligo. Por lo tanto, nos preguntamos cómo de importante es la presencia de las cuatro repeticiones de 13meros para que se produzca dicha interacción. Para ello, se diseñaron tres oligos de la misma longitud (70 nt) pero con distintas secuencias (**Figura 4.11 (a)**): el primer oligo, L, contiene la primera repetición (L) de la secuencia de la hebra inferior de la región rica en ATs y las otras tres repeticiones de la hebra superior; el segundo oligo, L-M1, contiene las dos primeras repeticiones (L-M1) de la hebra inferior y las otras dos repeticiones

de la hebra superior; y el tercer oligo, L-M2, contiene las tres primeras repeticiones (L-M2) de la hebra inferior y la última de la hebra superior.



**Figura 4.11. Necesidad de los cuatro 13-meros para que se produzca el complejo ternario.** **a)** Secuencia de la región rica en ATs. **b)** Porcentaje de formación de los complejos ternarios observados por AFM. **c)** Experimentos de SPR con concentraciones crecientes de proteína TrfA de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1  $\mu$ M, para cada uno de los oligos. Estos experimentos fueron realizados por el grupo del Prof. Igor Konieczny. **d)** Imágenes de AFM para cada experimento. La escala de color de oscuro a brillante corresponde con -0.5 y 3 nm. La nomenclatura utilizada corresponde con L: contiene la primera repetición (L) de la secuencia de la hebra inferior de la región rica en ATs y las otras tres repeticiones de la hebra superior. L-M1: contiene las dos primeras repeticiones de la hebra inferior (L-M1) y las otras dos repeticiones de la hebra superior. L-M2: contiene las tres primeras repeticiones de la hebra inferior (L-M2) y la última de la hebra superior.

Los oligos L, L-M1 y L-M2 se utilizaron en experimentos de SPR para obtener información de la formación del complejo doble TrfA:oligo. Se observó que la proteína TrfA no interaccionaban con el oligo cuando se eliminaba tan sólo uno de los cuatro 13-meros **Figura 4.11 (c)**.

Para detectar la formación de complejos ternarios se empleó el AFM con los tres oligos correspondientes. Las imágenes características de AFM se pueden

observar en la **Figura 4.11 (d)**. Aplicando el mismo criterio de alturas (complejos triples  $\sim 3$  nm) se cuantificó el número de complejos triples, dando en todos los casos porcentajes por debajo del 4% **Figura 4.11 (b)**. Por lo tanto, concluimos que las cuatro repeticiones son importantes para que se forme el complejo ternario DNA:TrfA:oligo.

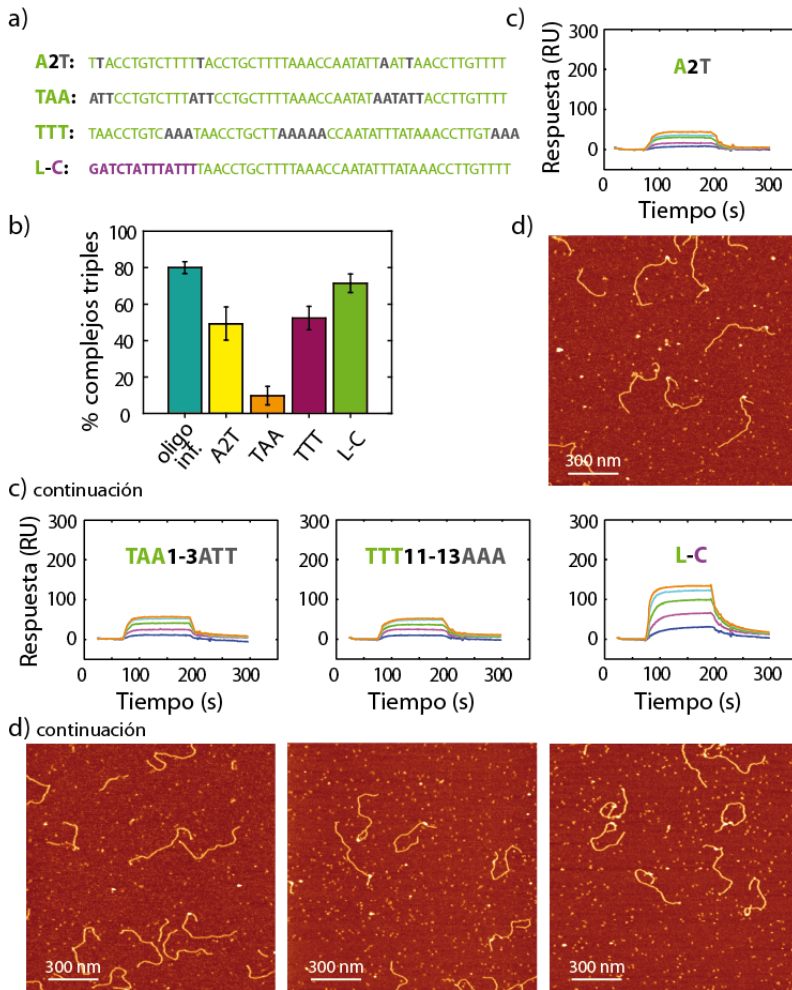
#### 4.1.5. Mutaciones puntuales en la secuencia del oligo inf. modifican la formación del complejo ternario

Las cuatro repeticiones son necesarias para que produzca el complejo ternario DNA:TrfA:oligo. Por lo tanto, nos plantemos ahora qué ocurre cuando solamente hacemos una mutación puntual en la secuencia de los 13-meros. Para ello se diseñaron distintos oligos con mutaciones en las bases más conservadas: en el primer oligo, A2T, se ha sustituido la segunda base (A) por su complementaria (T); en el segundo oligo, TAA, se han sustituido las tres primeras bases (TAA) por sus complementarias (ATT); en el tercer oligo, TTT, se han sustituido las bases entre las posiciones 11 y 13 (TTT) por sus complementarias (AAA); y en el cuarto oligo, L-C, se ha cambiado la primera repetición (L) del *OriV* por la primera repetición (L) del origen del DNA cromosómico de *E. coli*, llamado *OriC* (**Figura 4.12 (a)**).

De nuevo, se repitieron los experimentos de SPR con los nuevos oligos para obtener información de la interacción TrfA:oligo (ver **Figura 4.12 (c)**). Los experimentos de SPR mostraron que la mutación de una de las bases era suficiente para reducir la interacción de TrfA con el oligo. Sin embargo, cuando se sustituye la primera repetición (L) del *OriV* por la primera repetición (L) del *OriC* cuya secuencia es completamente distinta, la ocurrencia de formación del complejo binario es parecida a la del oligo inf. sin modificar.

Siguiendo el mismo procedimiento, se repitieron los experimentos de AFM con estos nuevos oligos (ver **Figura 4.12 (b y d)**). En este caso se observó que el cambio de una única base (oligo A2T) reduce la formación del complejo ternario de un 80% a un 49%. Por otra parte, el cambio de tres pares de bases puede reducir la interacción hasta un 10% en el caso del oligo TAA, o un 52% en el caso del oligo TTT. Sin embargo, el resultado más sorprendente se obtiene con el oligo L-C. El origen del DNA cromosomal de *E. coli* (*OriC*) está formado por tres repeticiones de 13 bp cuya secuencia (GATCTnTTntttt) no se parece a la del *OriV* (TAAncntntTTt). En este caso, la formación de complejos triples se reduce ligeramente a un 72% frente al 80% del oligo inf.

Ambos resultados (SPR y AFM) muestran un buen acuerdo e indican que pequeñas modificaciones en las bases más conservadas pueden disminuir notablemente la eficiencia de formación del complejo ternario, mientras que cambiando radicalmente la secuencia por otra secuencia equivalente en otro origen, la formación del complejo triple se ve afectada muy levemente. Por lo tanto se puede decir que hay secuencias que son identificadas por la proteína permitiendo o impidiendo que la iniciación de la replicación se lleve a cabo.



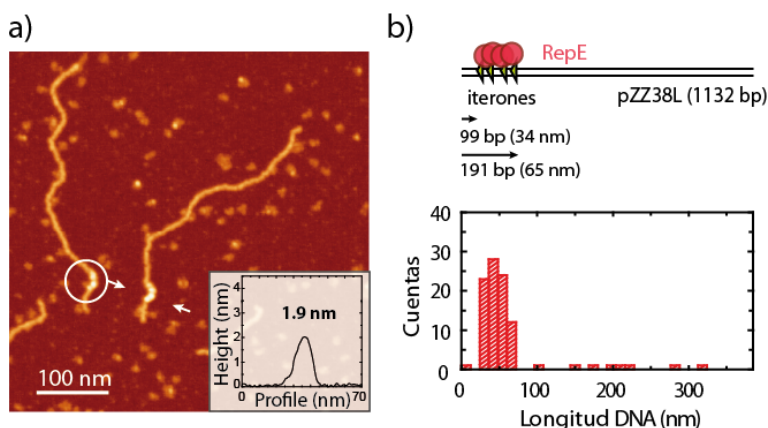
**Figura 4.12. Mutaciones puntuales en el oligo inf. reducen la eficiencia de formación del complejo triple.** a) Secuencia de los oligos con las mutaciones correspondientes A2T: la segunda adenina se ha cambiado por una timina. TAA: Las primeras tres bases se han cambiado por sus complementarias ATT. TTT: Las tres timinas situadas entre las posiciones 11 y 13 se han sustituido por sus complementarias AAA. L-C: la primera repetición entera se ha cambiado por la primera repetición del DNA cromosomal de *E.Coli*. b) Porcentaje de formación de los complejos ternarios observados por AFM. c) Experimentos de SPR con concentraciones crecientes de proteína TrfA de 0.1. 0.25, 0.5, 0.75 y 1  $\mu$ M, para cada uno de los oligos. Estos experimentos fueron realizados por el grupo del Prof. Igor Konieczny. d) Imágenes de AFM. La escala de color de oscuro a brillante entre 0 y 2.5 nm.

## 4.2. Proteína RepE

Los experimentos realizados con TrfA sugieren un modelo en el que la proteína *Rep* interacciona específicamente con una de las dos hebras de la región rica en ATs, cuando se forma la burbuja de replicación. De hecho, en la **Figura 4.1** se observa que los iterones están siempre cerca de la región rica en ATs, mientras que la posición de las cajas de DnaA varía de unos plásmidos a otros. Por lo tanto, para comprobar que la función de las proteínas *Rep* es estabilizar la burbuja de replicación, hemos repetido algunos experimentos clave con la proteína RepE, la proteína *Rep* del plásmido F. En este plásmido, hay cuatro iterones en lugar de cinco y las cajas de DnaA están situadas junto a la región rica en ATs en lugar de junto a los iterones como ocurría en el plásmido RK2.

### 4.2.1. Unión de RepE a los iterones

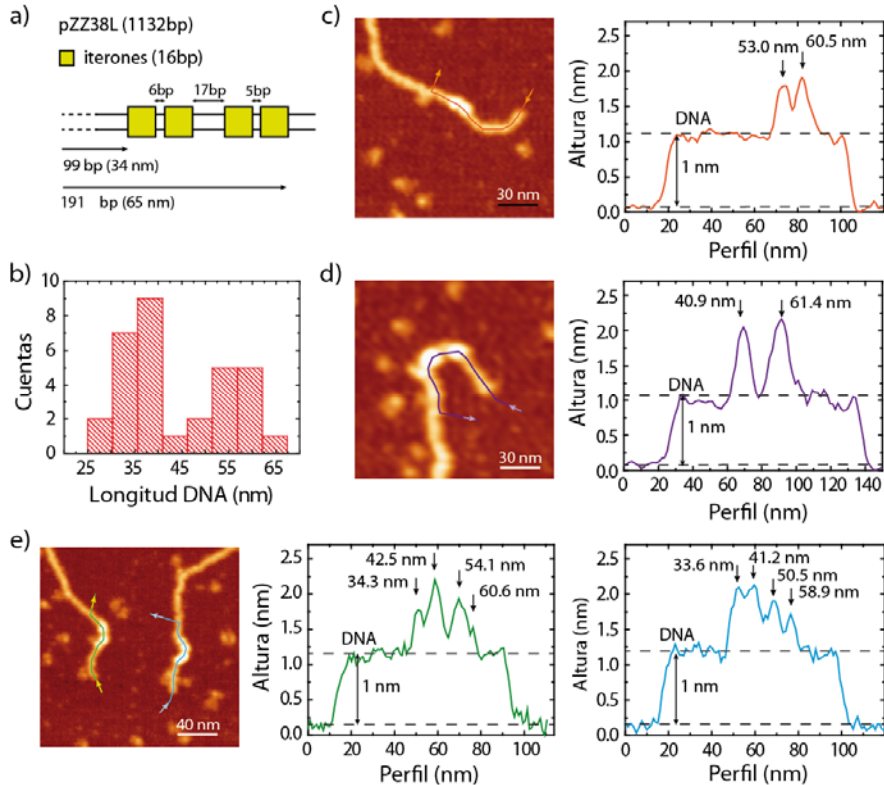
De nuevo, se comprobó que la proteína RepE interacciona con el DNA en la región de los iterones. En este caso, la molécula lineal de DNA contiene los cuatro iterones que forman el *OriS*, situados entre los 34 y 65 nm de uno de los extremos. Una imagen característica de AFM del experimento con DNA:RepE se muestra en la **Figura 4.13 (a)**. En el 56% de las moléculas de DNA se observó un punto más brillante en la posición de los iterones, lo que atribuimos a la interacción de RepE con el DNA. El histograma de posiciones se muestra en la **Figura 4.13 (b)** junto con un esquema de la posición de los iterones en el DNA.



**Figura 4.13. Interacción de RepE con el DNA en la región de los iterones. a)** Imagen representativa de AFM donde se muestran dos complejos dobles de DNA:RepE. Las flechas indican el inicio y final del perfil de alturas mostrado como inserto en la imagen y el círculo indica otro complejo doble. **b)** Esquema de la posición de los iterones en el fragmento lineal de DNA (parte superior) e histograma de posiciones de la interacción DNA:RepE (parte inferior).



La altura del complejo DNA:RepE se caracterizó con el programa WSxM y fue de  $1.9 \pm 0.5$  nm. Un ejemplo de un perfil de alturas medido entre las dos flechas de la imagen se puede ver en la gráfica de la **Figura 4.13 (a)** y otro complejo con las mismas características está indicado con un círculo.

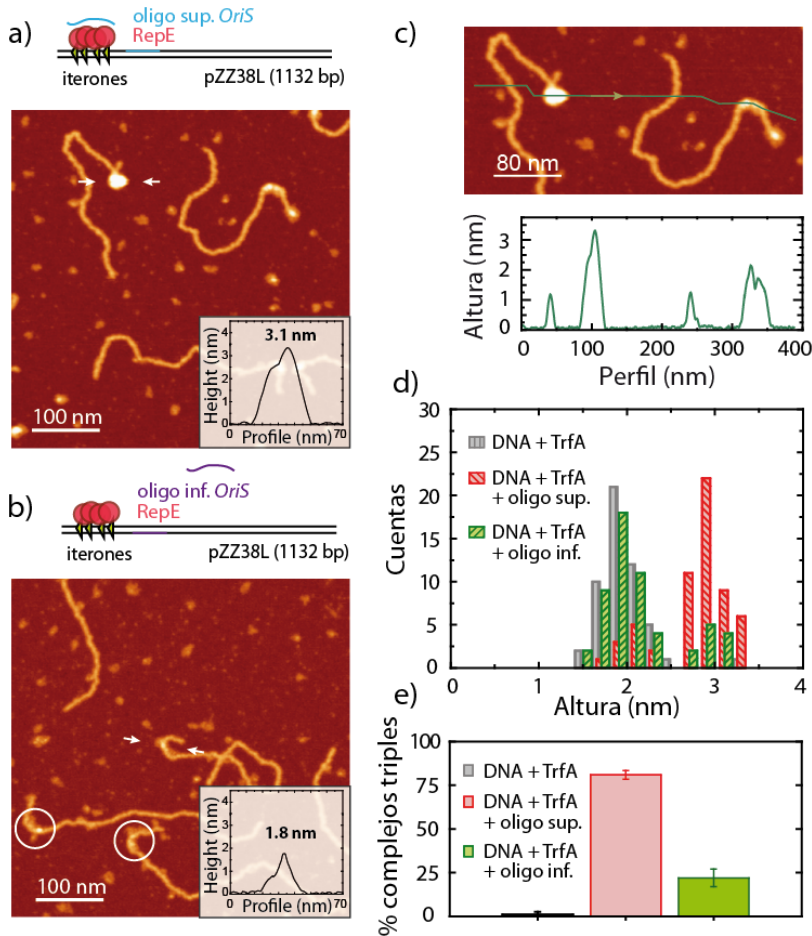


**Figura 4.14. Visualización de proteínas individuales de RepE unidas a los iterones.** **a)** Esquema de la posición de los iterones y la separación entre ellos. **b)** Histograma de posiciones medidas a partir de las imágenes de AFM. **c), d)** y **e)** Ejemplos de perfiles de alturas donde se observan picos en las posiciones correspondientes a los iterones.

En estos experimentos, se observaron en varias ocasiones picos característicos en los perfiles de las moléculas tomados en la región de los iterones (**Figura 4.14 (c-e)**). La distribución de dichos picos se muestra en el histograma de la **Figura 4.14 (b)**). Dicha distribución de picos, corresponde con la posición de los iterones en la molécula, puesto que los cuatro iterones que forman el *OriS* están distribuidos por pares y separados por 17 bp (ver esquema de la **Figura 4.14 (a)**). De hecho, la posición de los picos observados en los perfiles de las moléculas de DNA corresponden con la posición de los iterones individuales. Esto indica que los picos representan proteínas RepE individuales localizadas en la posición de los iterones.

#### 4.2.2. Unión de RepE a los iterones y a la región rica en AT simultáneamente: caracterización de alturas

Siguiendo la misma estrategia que en el caso de la proteína TrfA, se diseñaron dos oligos: uno con la secuencia de la hebra superior y otro con la secuencia de la hebra inferior de la región rica en ATs del *OriS* (oligo sup. y oligo inf., respectivamente).



**Figura 4.15. Formación del complejo triple DNA:RepE:oligo.** **a) y b)** Imágenes de AFM del experimento involucrando los tres componentes: DNA:RepE:oligo con la secuencia de la hebra superior e inferior de la región rica en ATs respectivamente. Las flechas blancas indican el principio y final del perfil de altura mostrado en la gráfica. Los círculos indican complejos representativos como los que se muestran en el perfil de alturas. **c)** Perfil de altura donde se observan las diferencias entre un complejo triple (altura 3 nm aprox.) y un complejo doble (altura 2 nm aprox.). **d)** Histograma de alturas de los tres experimentos: DNA:RepE, DNA:RepE:oligo sup. y DNA:RepE:oligo inf. **e)** Porcentaje de complejos triples observados en los tres experimentos.



Para estudiar si la proteína RepE sigue el mismo mecanismo de unión que TrfA, es decir, interacciona específicamente con una hebra de la región rica en ATs, se utilizó el mismo protocolo: se incubó primero el DNA con la proteína RepE durante 10 minutos y posteriormente se añadió el oligo correspondiente incubando la mezcla durante 10 minutos más. Las imágenes de AFM características para cada experimento se muestran en la **Figura 4.15**.

En ambos casos se observó un complejo en la posición de los iterones. Sin embargo, la mayor parte de los complejos obtenidos con el oligo sup. eran más brillantes en la imagen, con una altura media de  $2.9 \pm 0.4$  nm, mientras que la mayor parte de los complejos obtenidos con el oligo inf. tenían una altura de  $1.9 \pm 0.5$ , equivalente al complejo doble DNA:RepE. Aplicando el criterio de alturas para distinguir entre complejos dobles (altura de 2 nm aprox.) y complejos triples (altura de 3 nm aprox.) se contabilizaron los complejos triples en ambos experimentos. En el caso del oligo sup. la formación del complejo triple se produce en el 81% de las moléculas totales mientras que este porcentaje se reduce a un 22% en el caso del oligo inf.

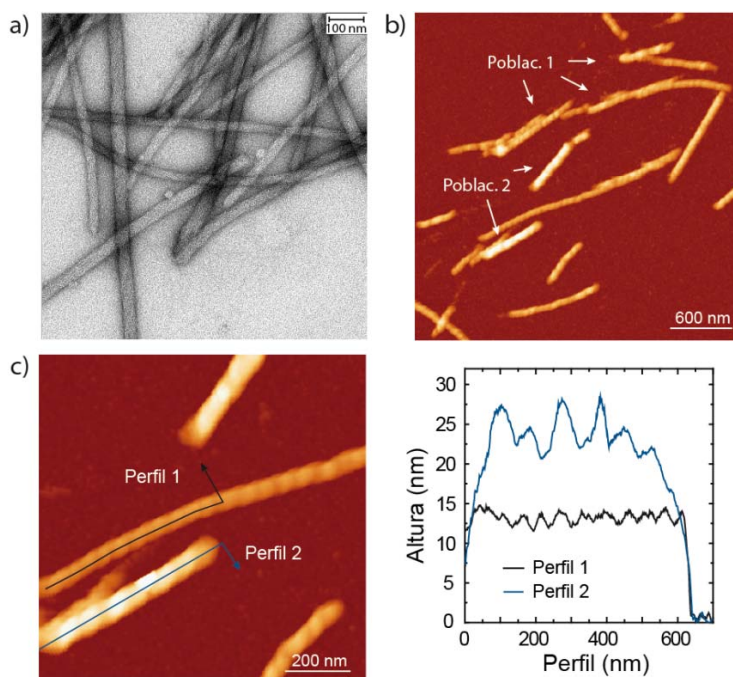
Podemos por tanto afirmar que en el caso de la proteína RepE también existe una especificidad de la secuencia para formar el complejo triple, pero en este caso, la eficiencia de unión del oligo sup. o inf. es menor que en el caso de TrfA.

Nótese que para RepE, el oligo que se une es el que contiene la secuencia de la hebra superior de la región rica en ATs, al contrario de lo que ocurría con TrfA. Esta diferencia no es relevante en cuanto a que la elección de la hebra superior o hebra inferior del DNA es arbitraria.

### 4.3. Proteína RepA

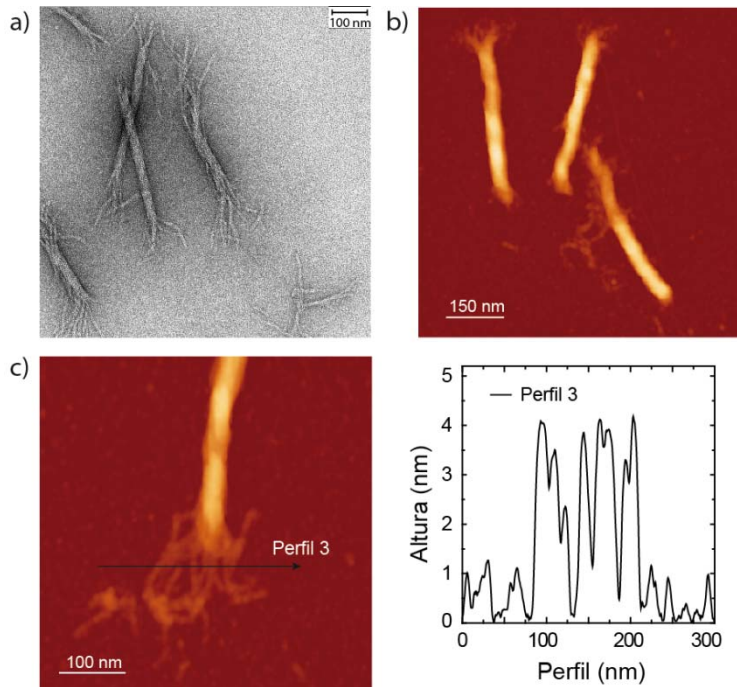
En esta sección se describen los resultados relativos a la caracterización de las estructuras amiloides formadas por el dominio WH1 de la proteína RepA (A31V).

La adsorción de las fibras a la superficie de la mica se realizó con poly-l-lysina. A pesar de la alta concentración de poly-l-lysina utilizada (0.01%), la eficiencia de adsorción de las fibras a la mica fue muy pequeña. Otros métodos de adsorción, como depositar la muestra directamente sobre la mica, o pretratar la mica con  $MgCl_2$ , no dieron mejores resultados. No obstante, pudimos observar fibras con una estructura similar a la observada por microscopía electrónica por nuestros colaboradores (**Figura 4.16 (a)**).



**Figura 4.16. Fibras de RepA.** **a)** Imagen de fibras de RepA obtenida con microscopía electrónica por nuestros colaboradores. **b)** Imagen de fibras de RepA obtenida con AFM donde se indican las dos poblaciones de fibras. **c)** Zoom de la imagen de AFM junto con los perfiles de alturas de dos fibras de diferentes poblaciones.

La helicidad que mostraban las fibras era en todos los casos a izquierdas. A partir de las imágenes de AFM se realizó una clasificación de las fibras en dos poblaciones (**Figura 4.16 (b)**). La primera tenía alturas más bajas, de  $16 \pm 2$  nm para los picos y de  $13 \pm 2$  nm para los valles. Esta población era la más abundante con longitudes variables entre 0.2 y 2  $\mu\text{m}$ . Algunas fibras estaban rotas o dobladas, posiblemente debido al secado y lavado. Otras fibras estaban agrupadas en pares, pero nunca en grupos de más de cuatro. A partir de la medida de los perfiles de alturas (como el **perfil 1** de la **Figura 4.16**) se obtuvo un paso de hélice de  $64 \pm 6$  nm. La segunda población de fibras era la menos abundante y se caracterizaba por tener una altura mayor (más brillantes en la imagen) con alturas de  $25 \pm 2$  nm para los picos y  $21 \pm 2$  nm para los valles. Un ejemplo se muestra en el **perfil 2** de la **Figura 4.16**. La gran variabilidad observada en las alturas de las fibras para cada población y para fibras individuales parece indicar que son estructuras heterogéneas formadas por un número variable de protofilamentos.



**Figura 4.17. Fibras de RepA después de zizallarlas mecánicamente.** **a)** Imagen de fibras de RepA desensamblándose en protofibras obtenida con microscopía electrónica por nuestros colaboradores. **b)** Imagen de fibras de RepA obtenida con AFM donde se observan las protofibras desensamblando la fibra. **c)** Zoom de la imagen de AFM junto con un perfil de altura de los protofilamentos.

Para observar los protofilamentos que forman las fibras, sometimos a las fibras a estrés mecánico pipeteando fuertemente con una punta de pequeño calibre. El proceso de estrés mecánico aplicado a las fibras provocó que éstas se desensamblen en sus protofilamentos constituyentes. Las imágenes obtenidas con EM y AFM fueron muy parecidas (**Figura 4.17 (a y b)**). Se observó que algunas fibras han perdido parte de su helicidad, desensamblándose por los extremos y exponiendo los protofilamentos. Los protofilamentos eran más uniformes y homogéneos en alturas, con un valor medio de  $3.9 \pm 0.3$  nm. Un ejemplo de un perfil que incluye a varios protofilamentos se muestra en el **perfil 3** de la **Figura 4.17**. La corta longitud de los protofilamentos y resolución de nuestro equipo no permitieron distinguir la helicidad de los mismos.

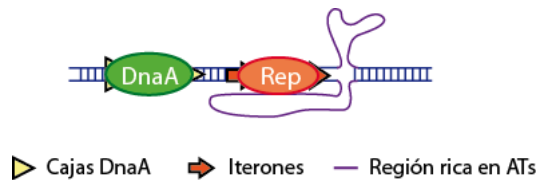
## 5. Discusión de los resultados

Dado que el AFM requiere que la muestra esté adsorbida a una superficie (en este caso mica), es posible que algunas interacciones se vean reducidas por el efecto de la adsorción. Un ejemplo de este comportamiento viene descrito en el artículo de (Sorel, 2006) donde se estudia la interacción de la enzima de restricción EcoRI con el DNA. En el artículo proponen que a pesar de que la eficiencia de unión DNA:proteína es alta en la reacción (observado por técnicas multipartícula como un alto rendimiento de corte), la eficiencia se reduce notablemente al adsorber las moléculas de DNA en la superficie. Este hecho se explica porque las cargas electrostáticas de la superficie desestabilizan la interacción DNA:proteína cuando dicho complejo se aproxima a la superficie. Sin embargo, este no es el caso para las proteínas *Rep*. La gran similitud de los datos obtenidos mediante SPR y AFM nos hace pensar que este complejo no se ve afectado por la adsorción a la superficie.

La formación del complejo doble entre el DNA (que contiene los iterones) y la proteína *Rep* correspondiente, TrfA o RepE, se produce en la región específica de los iterones. Además, la proteína *Rep* interacciona simultáneamente con los iterones y con una de las hebras de la región rica en ATs. En el plásmido RK2 se ha observado que el porcentaje de unión de la proteína TrfA aumenta de un 23% a un 80% cuando se incluye el oligo inf. Esto quiere decir que: o bien la proteína TrfA está unida a la región de los iterones, pero no conseguimos verla; o bien que la presencia del oligo favorece la interacción de TrfA con los iterones. En un experimento control sin proteína se comprobó que el oligo no interaccionaba con el DNA. Esta formación del complejo triple DNA:proteína:oligo es altamente específica con la secuencia del oligo, es decir, mientras que el oligo que contiene la secuencia de la hebra inferior en la región rica en AT (oligo inf.), se une con gran afinidad, el oligo con la secuencia complementaria (oligo sup.) no se une. Se han visto estadios intermedios modificando puntualmente algunas bases del oligo inf., encontrando que ciertas mutaciones reducen notablemente la formación del complejo triple (oligo inf. TAA) mientras que otras tan sólo lo reducen en un 50% (oligo inf. A2T y TTT). Por otra parte, cambiando una de las cuatro repeticiones por la correspondiente repetición del origen cromosómico OriC de *E.coli*, la unión sigue siendo elevada.

Estos resultados han sido equivalentes a lo observado con otra proteína *Rep*, la proteína RepE del plásmido F. La proteína RepE se une a los iterones y las imágenes de AFM han permitido observar proteínas individuales unidas a las posiciones específicas de los iterones. En el origen *OriS*, la posición de los iterones está distanciada de 6, 17 y 5 bp consecutivamente y esta separación es suficiente para que la resolución lateral del AFM permita observar proteínas individuales. Sin embargo, en el caso del *OriV*, la separación es menor, de 6, 6, 5 y 6 bp consecutivamente, y en este caso no permite distinguir proteínas individuales.

Además, la proteína RepE es capaz de interaccionar simultáneamente con los iterones y con una de las hebras de la región rica en ATs. Estos resultados sugieren un modelo en el cuál la proteína *Rep* está implicada en estabilizar la apertura de la burbuja de replicación facilitando el sustrato para la helicasa y la polimerasa. De hecho, en la **Figura 4.1** observamos que la posición de los iterones en los plásmidos está en todos los casos contigua a la región rica en ATs, donde se forma la burbuja de replicación. Por lo tanto, las proteínas *Rep* podrían desempeñar una función importante estabilizando el complejo como se muestra en la **Figura 4.18**.



**Figura 4.18. Modelo del complejo de replicación en plásmidos.** La proteína *Rep* interacciona con los iterones y la región rica en ATs, estabilizando la burbuja de replicación.

En los orígenes de replicación de DNA cromosomal, la proteína DnaA bacteriana interacciona específicamente con las cajas de DnaA y la región rica en ATs. Sin embargo, las proteínas DnaA son estructuralmente diferentes a las proteínas *Rep*, ya que contienen un dominio AAA+ que es el responsable de la interacción con la región rica en ATs. En plásmidos, las proteínas *Rep* no tienen dominios AAA+, sino dominios WH (**Figura 4.3**) que estarían implicados en la interacción con el DNA. Estos son los primeros resultados experimentales que proporcionan un modelo de proteínas de replicación de plásmidos.

Por otra parte, la caracterización de fibras amiloides es importante debido a las implicaciones que tienen estas estructuras en enfermedades degenerativas así como su implicación en factores epigenéticos.

Los resultados obtenidos mediante esta colaboración indicaron que las fibras estaban formadas por un número variable de protofibras que interaccionan entre sí lateralmente. Nuestras imágenes de AFM proporcionaron una clara helicidad a izquierdas de las fibras, mientras que no obtuvimos resolución suficiente para atribuir una helicidad a los protofilamentos.

La gran variabilidad encontrada en las fibras no permitió una reconstrucción tridimensional de las fibras por microscopía electrónica. Sin embargo, al cizallar las fibras provocando el desensamblaje en protofilamentos, se obtuvieron protofilamentos homogéneos. A partir de los cuales se pudo proceder a la reconstrucción por microscopía electrónica. Ajustando el volumen de la proteína en la reconstrucción, se atribuyó que las fibras estaban formadas por monómeros de la proteína de RepA, en lugar de por dímeros. Esto indica, que la proteína favorece su disociación para formar las fibras amiloides.



## 5. Otras aplicaciones de la microscopía de fuerzas a estructuras autoensambladas

En este capítulo vamos a tratar otros proyectos que surgen de distintas colaboraciones durante la tesis. Entre ellas destacamos las siguientes:

1. **Aplicación de los ácidos nucleicos a la nanotecnología: estructuras de DNA origami.**
2. **Interacción entre el péptido KF y el DNA.**
3. **Caracterización de filamentos de TubZ.**





## 1. Aplicación de los ácidos nucleicos a la nanotecnología: estructuras de DNA origami

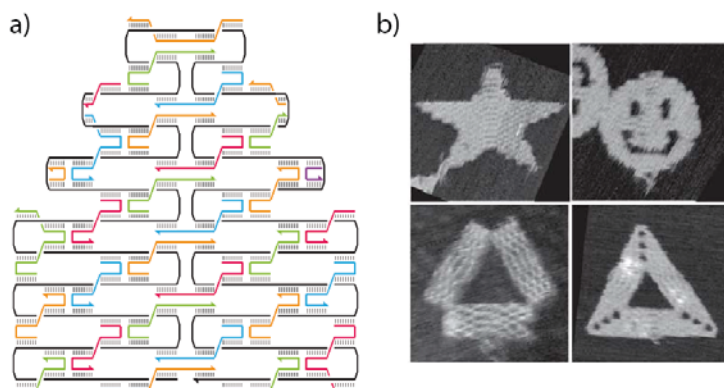
En esta sección comentaremos el trabajo de caracterización de estructuras de DNA origami que se ha llevado a cabo como colaboración con:

- El grupo del Prof. Dr. Ulrich F. Keyser (Laboratorio Cavendish, Universidad de Cambridge, Reino Unido) que utilizan estructuras de DNA origami como nanoporos.
- Un grupo de estudiantes (*Nanosaurus*) dirigidos por el Prof. Dr. Ralf Seidel (Universidad de Dresden, Alemania). El equipo *Nanosaurus* se presentó a la competición BIOMOD 2012 con un diseño de una estructura de DNA origami como nanocontenedor.

### 1.1. Introducción al DNA origami

Fuera de la biología tradicional, las moléculas de DNA pueden emplearse como piezas de LEGO nanométricas para construir nanoestructuras más grandes. Esta disciplina se conoce como nanotecnología del DNA y está basada en la alta especificidad que hay en la hibridación de bases complementarias. El concepto es sencillo: una hebra de cadena sencilla de DNA hace de andamiaje (*scaffold*) y unos oligos con secuencias complementarias hacen de grapas (*staples*) hasta plegar la larga molécula de ssDNA formando una estructura en 2D o 3D con la forma deseada. Generalmente se utiliza como andamiaje el DNA del fago M13, que es una molécula de DNA monocatenaria circular de aproximadamente 6500 nt de longitud. Los oligos que hacen como punto de anclaje, se diseñan con la ayuda de programas específicos para ello. Algunos ejemplos de estas nanoconstrucciones se muestran en la **Figura 5.1** (Rothemund, 2006).

Este campo se comenzó a desarrollar hace algo más de 30 años y desde entonces ha permitido abrir una gran variedad de aplicaciones y herramientas (Pinheiro, 2011) (Kuzuya, 2014). Algunos ejemplos son: nanocontenedores biocompatibles para el transporte de fármacos, nanoherramientas que se activan bajo estímulos químicos, nanorobots que inmovilizan enzimas o drogas para prevenir o afectar su actividad biológica, etc.



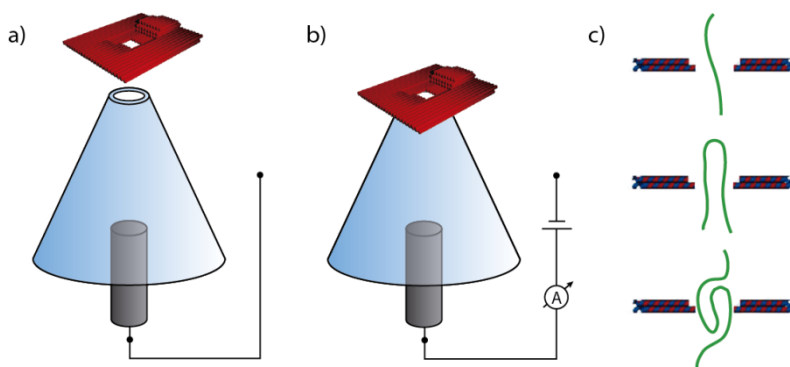
**Figura 5.1. Estructuras DNA origami.** **a)** Ejemplo de un diseño de DNA origami. El ssDNA que hace de andamio (*scaffold*) es de color negro y los oligos que hacen de grapas (*staples*) están dibujados en distintos colores. **b)** Ejemplos de imágenes de AFM de estructuras de DNA origami. Equema e imágenes adaptadas de (Rothmund, 2006).

En particular, nos vamos a centrar en dos aplicaciones de DNA origami: 1) como nanoporos y 2) como nanocontenedores.

### 1.1.1. Nanoporos de DNA origami

El grupo del Dr. Keyser estudia el transporte de moléculas a través de membranas a nivel de molécula individual. En las membranas celulares, gran parte del transporte se lleva a cabo mediante proteínas de membrana que tienen un poro central. Estas proteínas tienen forma de barril y permiten la difusión pasiva de iones y moléculas a través de la membrana celular. *In vitro*, los poros se pueden asemejar con pequeños orificios que separan dos medios acuosos distintos. Estos orificios se pueden crear a partir de capilares de vidrio, que se calientan y estiran hasta que se rompen formando orificios. Mediante sofisticadas máquinas que controlan la temperatura y la velocidad de estiramiento el grupo del Dr. Keyser ha logrado fabricar capilares con poros del orden de pocas decenas de nanómetros (Ghosal, 2013). Sin embargo, la heterogeneidad de estos capilares obliga a tener que caracterizarlos uno a uno mediante microscopía electrónica para determinar el tamaño del poro.

Con el fin de aumentar la reproducibilidad y evitar la caracterización individual de cada capilar, el grupo del Dr. Keyser ha diseñado unas estructuras de origami planas con un poro de tamaño definido entre 5 y 15 nm. Los origami se fijan a un poro capilar de entre 40-60 nm de diámetro al aplicar una diferencia de voltaje entre ambos lados del poro (ver **Figura 5.2 (a y b)**).



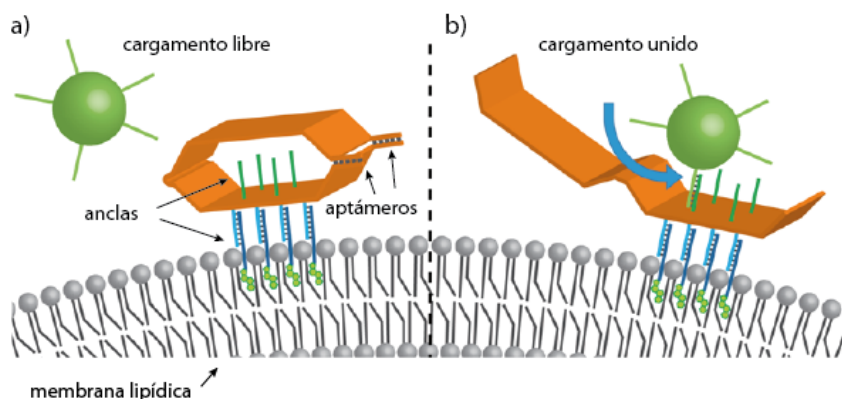
**Figura 5.2. Estructura de DNA origami como nanoporos. a) y b)** Antes y después de aplicar una diferencia de potencial entre ambos lados del poro. El origami se coloca en el poro del nanocapilar al aplicar una diferencia de potencial y se observa un cambio en la corriente iónica. **c)** Distintas configuraciones que puede adoptar el DNA cuando pasa por el poro.

El grupo del Dr. Keyser ha investigado la translocación de moléculas de DNA por nanoporos de origami. En función del tamaño del poro, las moléculas de DNA pueden pasar completamente estiradas o dobladas en dos, tres, etc. (ver **Figura 5.2 (c)**) Estas diferencias entre las moléculas plegadas y desplegadas se observa como un cambio en la corriente iónica y se puede detectar con gran precisión (Hernández-Ainsa, 2013).

### 1.1.2. Nanocontenedores de DNA origami

El diseño que el grupo *Nanosaurus* dirigidos por el Dr. Seidel realizó para el concurso BIOMOD consistió en una estructura de DNA origami como nanocontenedor. La estructura tiene forma de caja, con una tapa que puede abrirse y cerrarse mediante aptámeros. En el interior tiene unos oligos que actúan como anclas para unirse específicamente a ciertas moléculas y en la parte exterior, posee oligos modificados con colesterol para unirse a la membrana de liposomas. Un esquema de la estructura diseñada se muestra en la **Figura 5.3**.

Este diseño está pensado para atrapar o transportar pequeñas moléculas químicas usando el transporte facilitado por vesículas. El diseño es flexible en cuanto a que puede ser modificado para adaptarse a distintas necesidades, simplemente cambiando los oligos (anclas) a los que se le unen las sustancias específicamente.



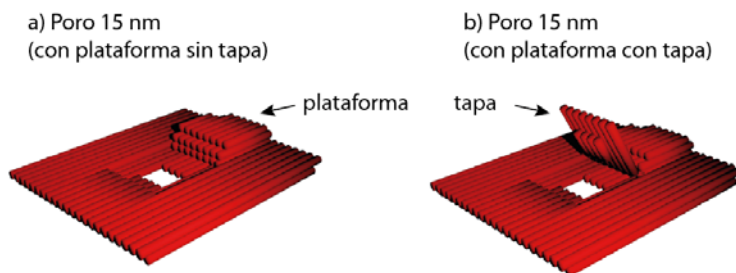
**Figura 5.3. Diseño de la estructura de DNA origami como nanocontenedor.** a) La caja de origami se encuentra cerrada y anclada a la membrana lipídica. Los oligos que hacen de anclas exteriores tienen una secuencia complementaria a otros oligos que tienen colesterol para que se una a la capa lipídica. Las anclas interiores tienen también una secuencia complementaria al cargamento que se desee transportar. b) Los aptámeros se desbloquean bajo la presencia del estímulo que se diseñe permitiendo así que el cargamento se una a las anclas interiores.

## 1.2. Materiales y métodos

### 1.2.1. Nanoporos de DNA origami

El grupo del Dr. Keyser nos proporcionó distintos diseños de estructuras de origami como nanoporos:

- 1) **Poro ~ 15 nm (con plataforma).** Estructuras planas cuadradas de 60 x 55 nm, con una altura de 4.5 nm y con un poro cuadrado en el centro de 15 nm de lado (**Figura 5.4**).

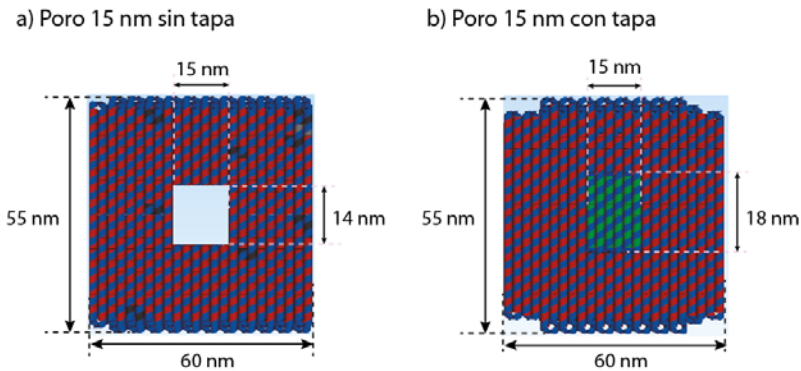


**Figura 5.4. Estructura de DNA origami con poro de 15 nm con plataforma.** Hay dos modelos: a) sin tapa y b) con tapa. La posición de la tapa no es como se muestra en el dibujo, sino que la tapa está más bien cerrada y fluctúa ligeramente en el plano.

Este diseño tenía una plataforma cuadrada en un lado de la parte superior, que incrementa la altura al doble en esa región. Hay dos

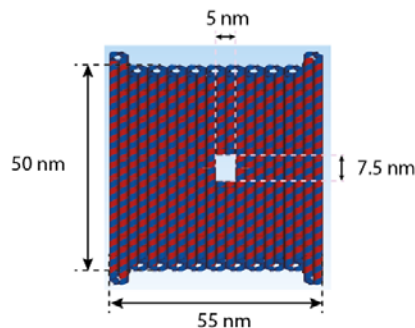
modelos: con tapa y sin tapa. La tapa está libre y puede fluctuar ligeramente en el plano de la estructura.

- 2) **Poro ~ 15 nm.** Mismo diseño que el anterior pero sin la plataforma superior (**Figura 5.5**). De nuevo hay dos modelos: con tapa y sin tapa. En este caso, la tapa está bloqueada para que no se pueda abrir, creando una estructura completamente plana. La altura es homogénea en toda la estructura e igual a 4.5 nm.



**Figura 5.5.** Estructura de DNA origami con poro de 15 nm. Hay dos modelos: **a)** sin tapa y **b)** con tapa.

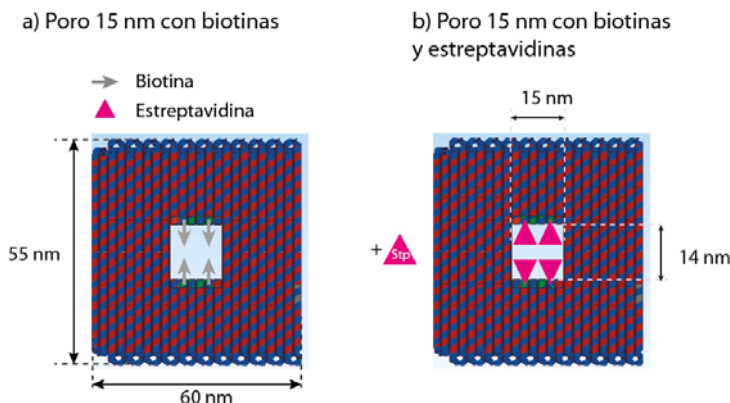
- 3) **Poro ~ 5 nm.** Mismo diseño que el anterior (poro ~ 15 nm) pero con un tamaño de poro más pequeño de ~ 5 nm (**Figura 5.6**). En este caso sólo hay un modelo: sin tapa. La altura de la estructura es homogénea e igual a 4.5 nm.



**Figura 5.6.** Estructura de DNA origami con poro de 5 nm sin tapa.

- 4) **Poro ~ 15 nm (funcionalizado).** Mismo diseño que el del poro ~ 15 nm pero en este caso la estructura contiene cuatro biotinas an-

cladas al poro (**Figura 5.7**). Al incubarlo con estreptavidinas, éstas se unen a las biotinas con una alta afinidad.



**Figura 5.7. Estructura de DNA origami con poro de 15 nm funcionalizado. a)** La posición de las biotinas se indica con flechas grises. **b)** Mismo diseño incubado con estreptavidina.

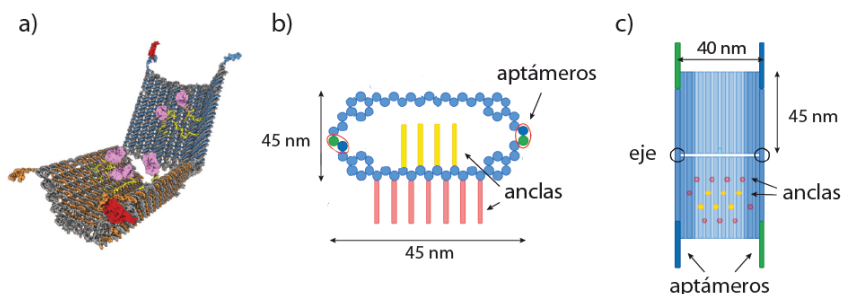
La preparación para AFM consistió en una dilución de la muestra correspondiente en el tampón TBE 0.5X complementado con 11mM  $MgCl_2$ , para obtener una concentración final de 4-5 ng/ $\mu$ l en un volumen final entre 3 y 5  $\mu$ l. El volumen final se depositó sobre mica previamente exfoliada y después de unos segundos se añadió directamente sobre la muestra 1 ml de tampón de medida (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$  and 2 mM  $NiCl_2$ ).

En el caso del origami funcionalizado con biotinas, éste se incubó con estreptavidinas en un exceso de 5X, es decir, 2  $\mu$ l de origami (7.7 nM de origami, ~30 nM de biotinas) se mezclaron con 1  $\mu$ l de estreptavidina (300 nM), durante 2 horas a temperatura ambiente.

### 1.2.2. Nanocontenedores de DNA origami

El grupo *Nanosaurus* dirigidos por el Dr. Seidel nos proporcionó dos estructuras de DNA origami como nanocontenedores (**Figura 5.8**): una muestra con la estructura abierta y otra muestra con la estructura cerrada. Ambas eran una versión simplificada que no contenía ni los aptámeros ni las anclas exteriores o interiores.

La preparación para AFM consistió en una dilución de 2  $\mu$ l de la estructura origami abierta o cerrada en el tampón TBE 0.5X complementado con 11 mM  $MgCl_2$ , en un volumen final de 5  $\mu$ l. El volumen final se depositó sobre la mica previamente exfoliada y después de unos segundos se añadió directamente sobre la muestra 1 ml del tampón de medida (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$  and 2 mM  $NiCl_2$ ).



**Figura 5.8. Estructura DNA origami como nanocontenedor.** a) Esquema en 3 dimensiones de la estructura. b) Vista frontal de la estructura cerrada. c) Vista desde arriba de la estructura abierta.

### 1.2.3. Condiciones de medida con el AFM

Las imágenes se tomaron con el AFM de Nanotec (Nanotec Electrónica, Madrid, Spain) en el tampón de medida indicado previamente usando el modo de medida de modulación en amplitud. La frecuencia de barrido utilizada es de 1 líneas/s con 256 puntos. El procesamiento de las imágenes consistió en una substracción de un plano global y de un *flatten plus*, realizado con el programa WSxM (Horcas, 2007). Las puntas utilizadas fueron el modelo TR400PSA (Olympus) y las Biolever (BL-RC150VB, Olympus). Ver **Tabla 1.1** para más detalle.

## 1.3. Objetivos

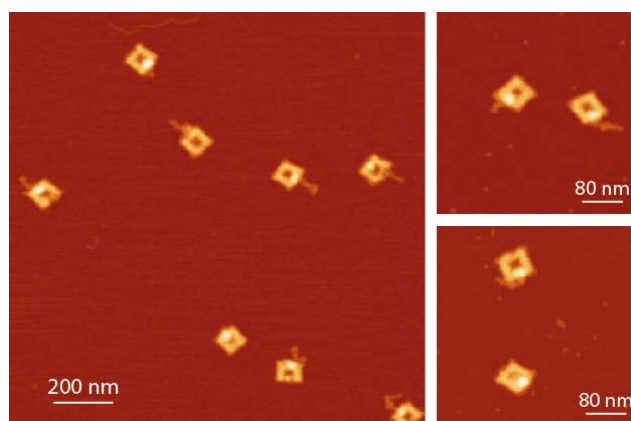
El objetivo principal de este proyecto fue comprobar que los diseños de DNA origami tienen la estructura diseñada. Para ello se caracterizó las estructuras de DNA origami proporcionando datos estructurales y de estabilidad de ambas.

## 1.4. Resultados experimentales

### 1.4.1. Nanoporos de DNA origami

Las primeras estructuras que estudiamos fueron las que tenían la plataforma. En primer lugar, decidimos observar las estructuras al aire, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la página 33 para las moléculas de DNA (adsorción con magnesio). Sin embargo, las estructuras de origami resultaron ser muy frágiles y las imágenes mostraron estructuras fragmentadas y heterogéneas (**Figura 5.9**). La mayor parte de los origami tenían una especie de *cola*, lo que indica que la estructura se había empezado a desensamblar. De manera general, el lado más débil era el que contenía la plataforma.

Las dimensiones laterales del origami eran las correctas (largo, lado con plataforma:  $54 \pm 4$  nm y ancho:  $51 \pm 4$  nm;  $N \geq 10$ ), y también para el tamaño del poro (largo:  $17 \pm 3$  nm y ancho:  $16 \pm 2$  nm;  $N \geq 10$ ). Sin embargo, la altura era un poco menor de lo esperado ( $3.3 \pm 0.3$  nm en la plataforma y  $5.1 \pm 0.4$  nm en la tapa) pero como ya hemos comentado anteriormente, en aire la altura de las moléculas es menor debido a la existencia de una capa de sales (Moreno-Herrero, 2003). En este caso particular, algunas zonas de la estructura de origami se habían llegado a desensamblar por completo, lo que también explica la reducción de la altura.



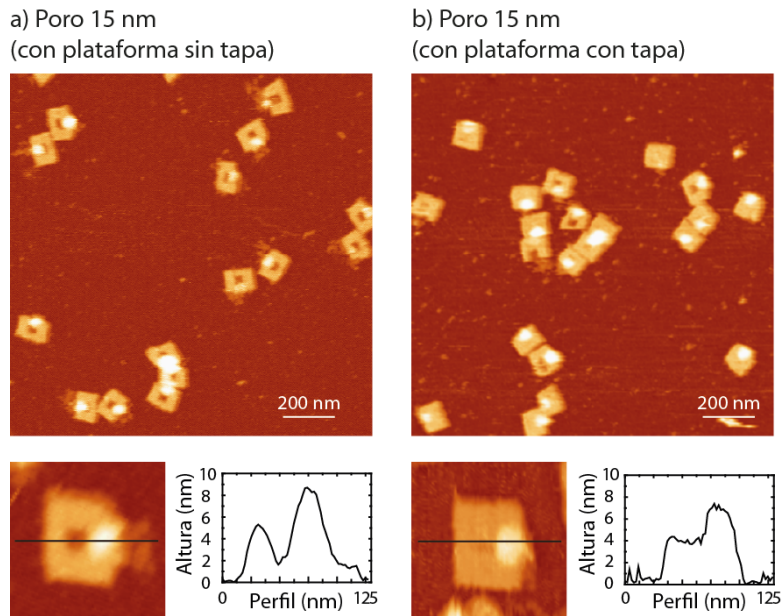
**Figura 5.9.** Imágenes de AFM en aire de las estructuras de DNA origami con un poro de 15 nm y marcadas con plataforma sin tapa. Escala de color (de oscuro a claro) de 0 – 7 nm.

Por lo tanto, decidimos repetir estos experimentos en medio líquido. El resultado para ambas estructuras marcadas (sin tapa y con tapa) se puede ver en la **Figura 5.10 (a y b)**, respectivamente. Las imágenes de AFM muestran que la mayor parte de las estructuras se encuentran en buenas condiciones y tienen las dimensiones correctas teniendo en cuenta el tamaño de la punta (largo:  $67 \pm 4$  nm y ancho:  $59 \pm 5$  nm; para el poro en el caso correspondiente, largo:  $19 \pm 5$  nm y ancho:  $17 \pm 2$  nm;  $N \geq 10$ ). alguna de ellas tiene *cola* (especialmente en las que no tienen tapa), aunque es más pequeña que lo que se veía en las imágenes tomadas en aire. Además, la altura corresponde perfectamente con lo esperado, lo que sugiere que aunque el origami se haya empezado a desensamblar, no ha sido suficiente como para modificar las dimensiones de la estructura. En el perfil de alturas de la **Figura 5.10 (a)** se muestra cómo en el poro la altura casi alcanza la superficie de la mica. Sin embargo, debido a que el radio de curvatura de la punta es de  $\sim 30$  nm, es imposible que penetre hasta el interior del poro.

En el caso de las estructuras con tapa, se observa que alguna de ellas no tienen tapa. Esto puede ser debido bien a que la tapa está completamente levantada (a pesar de que la simulación sugiere que no es así) o a que se haya



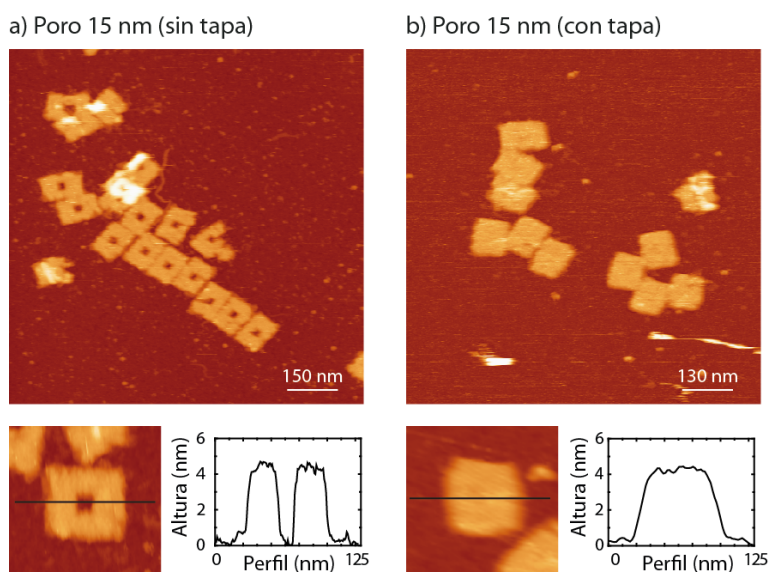
podido romper. La mayor parte de ellas se encuentran con tapa y como se muestra en el perfil de alturas la tapa cubre homogéneamente la superficie del origami con la altura esperada (**Figura 5.10 (b)**).



**Figura 5.10.** Imágenes de AFM en medio líquido de las estructuras de DNA origami con un poro de 15 nm y plataforma. **a)** Sin tapa. **b)** Con tapa. La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 12 nm.

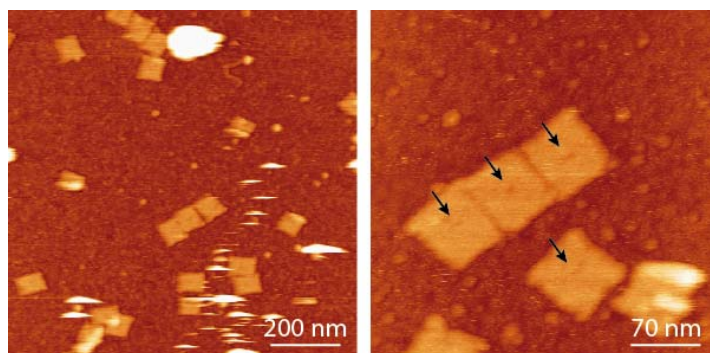
Cabe destacar que muchas de las estructuras se encuentran apareadas a otras. Esto puede ser un problema de cara a su aplicación como nanoporos, impidiendo que las estructuras se adsorban de manera individual. Sin embargo, nuestros colaboradores no han notado este efecto en sus experimentos.

El mismo experimento se realizó con las estructuras de DNA origami sin plataforma (**Figura 5.11**). En este caso, apenas se observan estructuras con cola, lo que significa que son más estables. En un principio, la plataforma se había diseñado para proteger el anclaje de la tapa. Sin embargo, estos experimentos demuestran que las estructuras son más estables sin ella. Las dimensiones obtenidas están en concordancia con el diseño realizado (largo:  $64 \pm 5$  nm y ancho:  $60 \pm 4$  nm; para el poro en el caso correspondiente, largo poro:  $16 \pm 3$  nm y ancho poro:  $15 \pm 2$  nm;  $N \geq 10$ ). La mayor parte de las estructuras se encuentran en buenas condiciones.



**Figura 5.11.** Imágenes de AFM en medio líquido de las estructuras de DNA origami con un poro de 15 nm. a) Sin tapa. b) Con tapa. La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 12 nm.

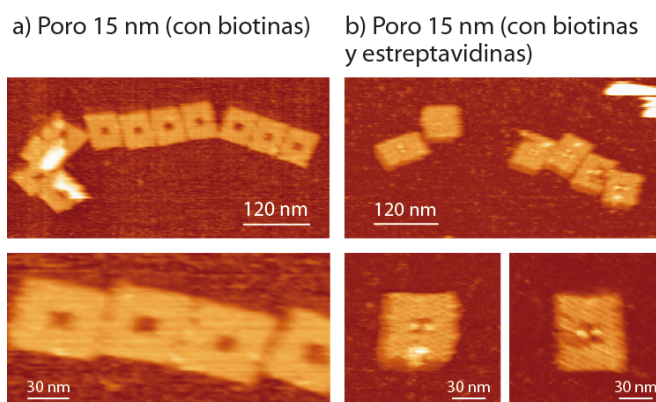
El siguiente modelo que se estudió fue el que tenía un poro de 5 nm. Las dimensiones obtenidas están en concordancia con el diseño (largo:  $60 \pm 5$  nm y ancho:  $52 \pm 4$  nm;  $N \geq 10$ ). Debido a que la punta que utilizamos para medir tiene un radio de curvatura de  $\sim 30$  nm, no es posible que la punta entre en poro tan pequeño. Sin embargo, es posible intuir un pequeño hueco en el centro del origami indicado con flechas negras en la **Figura 5.12**, que nos indica que no es una estructura completamente plana. A pesar de ello, no pudimos caracterizar el tamaño del poro.



**Figura 5.12.** Imágenes de AFM en medio líquido de las estructuras de DNA origami con un poro de 5 nm. La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 12 nm.

Por último, se observó la estructura funcionalizada con biotinas y posteriormente incubada con estreptavidinas como se describe en la sección de materiales y métodos. La biotina es una molécula muy pequeña que no puede ser vista con el AFM (al menos con nuestra configuración y modo de medida). Sin embargo, la estreptavidina es una proteína de mayor tamaño ( $\sim 5$  nm de diámetro) y que tiene una alta afinidad por la biotina. Es una de las uniones más fuertes, sin ser covalente, que se conocen.

En la imagen de AFM de la **Figura 5.13** se observa que las estructuras funcionalizadas con biotinas son idénticas a las que tienen un tamaño de poro de 15 nm sin funcionalizar. Sin embargo, tras incubarlas con estreptavidinas durante 2 horas a temperatura ambiente, la mayoría de las estructuras parecen planas, como si tuvieran tapa y estas proteínas aparecen visibles como dos puntos más brillantes. Concluimos por tanto que las estructuras se diseñaron y ensamblaron correctamente y que son capaces de incorporar estreptavidinas cuando se funcionalizan con biotinas.

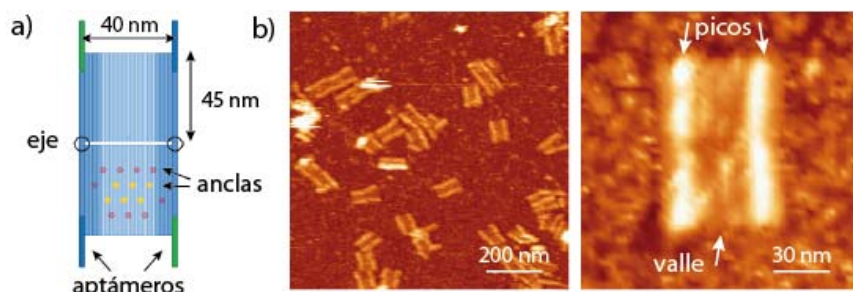


**Figura 5.13. Imágenes de AFM en medio líquido de las estructuras de DNA origami con poro de 15 nm y funcionalizadas. a)** Con biotinas y **b)** con biotinas y estreptavidinas. La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 12 nm.

#### 1.4.2. Nanocontenedores de DNA origami

Dada nuestra experiencia anterior, decidimos observar directamente los nanocontenedores de origami en medio líquido. Los experimentos de AFM mostraron un gran acuerdo en forma y tamaño con las estructuras diseñadas de DNA origami y observadas con TEM (datos no mostrados). Las dimensiones de las estructuras abiertas eran un poco mayores de lo esperado (ancho y largo,  $55 \pm 4$  nm y  $42 \pm 3$  nm, respectivamente) (ver **Figura 5.14**). Esto es debido a que las dimensiones laterales se han sobreestimado debido al efecto de dilación de la punta que, en estos experimentos tiene un radio de curvatura aproximado de unos 30 nm (Biolever, Olympus). Las palancas empleadas en líquido poseen una punta con un radio de curvatura mayor que

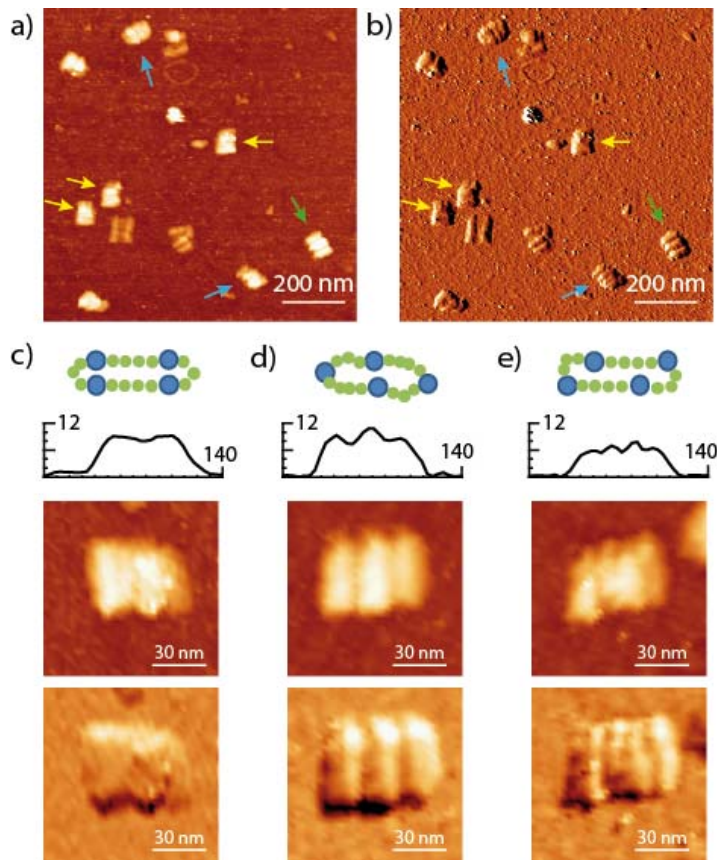
las palancas empleadas en aire. Por otro lado, poseen una constante de fuerza más pequeña (0.03 N/m) que permite observar las estructuras de origami sin romperlas. Puntas más duras, como son las TR400PSA (Olympus) con una constante de fuerza mayor (0.08 N/m) rompían las estructuras, especialmente las cerradas.



**Figura 5.14. Estructuras abiertas de DNA origami como nanocontenedores. a)** Esquema del nanocontenedor. En el caso de las muestras para AFM no se incorporaron ni los aptámeros ni los oligos ancla. **b)** Imagen de AFM y zoom de una estructura abierta. La escala de color (de oscuro a brillante) va de 0 – 12 nm.

El AFM proporcionó una medida precisa de las alturas. La media de altura en los picos fue de  $3.8 \pm 0.4$  nm, lo que corresponde bastante bien con los datos del diseño donde la estructura está formada por el equivalente a dos moléculas de DNA de cadena doble. El valor obtenido para la base de la estructura o valle, es de  $1.2 \pm 0.3$  nm, algo más pequeño de lo esperado. Esto puede ser debido a que los oligos libres en la muestra se absorban a la superficie, reduciendo así la altura medible con el AFM (ver fondo en la imagen detalle de la **Figura 5.14 (b)**).

En el caso de las estructuras cerradas se observó una muestra más heterogénea formada por tres poblaciones distintas (**Figura 5.15**): unas que tenían dos bandas (señaladas con fechas amarillas), otras con tres bandas (flechas verdes) y por último estructuras con cuatro bandas (flechas azules). A veces esta característica se observa mejor en la imagen de la derivada (**b**). Las tres poblaciones observadas con el AFM se pueden atribuir a tres conformaciones adquiridas al ser adsorbidas en la superficie. La primera población, la que tiene dos bandas, corresponde con la estructura adsorbida como en el diseño principal, donde las paredes del compartimento están una encima de la otra (**c**). Sin embargo, debido a que las estructuras son muy flexibles, éstas pueden rodar en la superficie como se indica en los esquemas de la **Figura 5.15 (c-e)**, formando estructuras con tres o cuatro bandas.



**Figura 5.15. Estructuras cerradas de nanocontenedores de DNA origami.** a) Imagen topográfica y b) derivada donde se observan las tres poblaciones de estructuras cerradas: estructuras con dos bandas (fechas amarillas), con tres bandas (flechas verdes) y con cuatro bandas (flechas azules). c-e) Imágenes ampliadas de las tres poblaciones (dos, tres y cuatro bandas, respectivamente) junto con un esquema y un perfil representativo. Imágenes topográficas (arriba) y las correspondientes derivadas (abajo). La escala de color (de oscuro a brillante) va de 0-12 nm para las imágenes topográficas.

Como ya se comentó antes, las estructuras cerradas son muy delicadas y la constante de fuerza de la punta utilizada es crítica. De hecho, en esta muestra se observa alguna estructura dañada o abierta.

## 1.5. Discusión de los resultados

En esta sección hemos comprobado que los DNA origami diseñados por nuestros colaboradores tienen la estructura deseada.

De manera general, se puede decir que las estructuras de DNA origami son estructuras delicadas y frágiles. Esto llama la atención, ya que a pesar de es-



tar formadas con los mismos nucleótidos que las moléculas de DNA de cadena doble, las estructuras origami se desestabilizan y rompen con facilidad, al contrario de las moléculas de dsDNA que son mucho más robustas. En el fondo, los origami no dejan de ser estructuras artificiales formadas por pequeños oligos que actúan como puntos de anclaje y que pueden liberarse en condiciones críticas, desestabilizando la estructura en tres dimensiones. Por otra parte, se puede decir que al igual que las moléculas de DNA, las estructuras de DNA origami son flexibles, como se ha visto en particular para los nanocontenedores de DNA origami.

Durante la preparación de las muestras en aire, las fuerzas que se ejercen durante el lavado y el secado son elevadas y en algunos casos se llega a desensamblar parte de la estructura. Este efecto se ha visto significativamente reducido al medir las muestras en medio líquido. En líquido, la fuerza aplicada por la punta depende tanto de la amplitud como de la constante de fuerza de la punta utilizada. En nuestros experimentos trabajamos con una amplitud constante y muy pequeña ( $\sim 2.5\text{-}3\text{ nm}$ ), por lo que cualquier variación en la constante de fuerza de la punta tendrá consecuencias directas. Por ejemplo, la fuerza aplicada con los Biolevers es de unos 75 pN y con las TR400PSA es de 200 pN, que es más del doble. Por lo tanto, una buena elección de la punta es fundamental para poder observar estas estructuras. Como es habitual en muchas situaciones, la buena elección de la punta es un compromiso entre el tamaño de la misma y la constante de fuerza. A veces cuando las estructuras son rígidas y no se rompen, interesa usar puntas más duras y optar a una mayor resolución lateral. Sin embargo, en otros casos, como con los DNA origami, es más conveniente utilizar puntas más blandas para no dañar la estructura, sacrificando la resolución.

Con estas dos colaboraciones hemos tenido la oportunidad de caracterizar estructuras de DNA origami para dos aplicaciones distintas como son los nanoporos o como futuros nanocontenedores para transportar cargamento específico en vesículas. Estas dos aplicaciones ilustran las múltiples aplicaciones que puede tener la nanotecnología de DNA.

## 2. Interacción del péptido KF con el DNA

En esta sección hablaremos de la importancia que tienen pequeños componentes anticancerígenos, como son los péptidos, y la caracterización de uno en particular con el AFM. Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la colaboración con el grupo del Prof. Félix Ritort (Universidad de Barcelona).

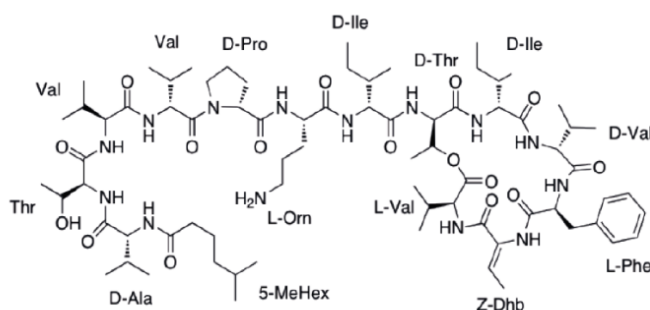
### 2.1. Introducción

La interacción de pequeños componentes intercalantes con el DNA ha sido estudiada durante muchos años. Unos se unen en la hendidura mayor o menor de la doble hélice, otros se unen inespecíficamente debido a interacciones electrostáticas, etc. La mayoría de ellos son inespecíficos, pero algunos han captado una atención especial debido a su actividad antitumoral.

La mayor parte de los fármacos anticancerígenos descritos hasta la pasada década provienen de productos naturales o derivados naturales (Balunas, 2005), o son componentes miméticos (casi idénticos) a los naturales (Newman, 2003). Sin embargo, la mayor parte de los componentes intercalantes anticancerígenos que se han estudiado han mostrado poca o ninguna actividad biológica relevante (Martinez, 2005). La mayoría de los componentes carecen de una especificidad hacia células cancerosas, por lo que su uso en tratamientos afectaría tanto a células malignas como benignas. No obstante, a pesar de que gran parte de los estudios realizados con posibles componentes anticancerígenos no han sido exitosos, han proporcionado información sobre propiedades antitumorales útiles para el diseño y síntesis de nuevos compuestos anticancerígenos en el futuro.

El péptido Kahalalide F (KF) es una molécula con aplicación potencial anticancerígena obtenida a partir de un molusco Hawaiano llamado *Elysia rufescens* (Hamann, 1993). Está formado por 14 residuos (López-Macià, 2001), trece de los cuales son altamente hidrofóbicos y uno tiene carga positiva (L-Orn) (ver **Figura 5.16**). Los residuos hidrofóbicos hacen que la molécula sea poco soluble y con gran tendencia a agregar, mientras que el residuo L-Orn favorece las interacciones electrostáticas con sustratos cargados negativamente como el DNA.

Se ha descrito que el KF tiene una actividad citotóxica contra ciertas líneas celulares (Sewell, 2005). El mecanismo de acción se basa en que el péptido se acumularía en la membrana plasmática y debido a su tendencia a agregar causa la disrupción de ésta (Molina-Guijarro, 2011).



**Figura 5.16. Estructura del péptido Kahalalide F (KF)** (Camunas-Soler, 2013).

Nuestros colaboradores han caracterizado este péptido con pinzas ópticas y han observado que el péptido KF se une electrostáticamente al DNA acumulando las moléculas de DNA en un agregado de KF (Camunas-Soler, 2013). Nuestro trabajo consistió en investigar esta interacción con AFM y ayudar a proporcionar una visión más completa de cómo funciona la molécula.

## 2.2. Materiales y métodos

Debido a que la interacción del KF con el DNA se lleva a cabo mediante afinidad electrostática, se evitó utilizar iones divalentes como método de adsorción de la muestra a la mica. Por lo tanto, todos los experimentos se realizaron pre-tratando la mica con espermina (Sigma Aldrich), que confiere a la mica una carga positiva permitiendo la adsorción de las moléculas de DNA. El pretratamiento se realizó depositando 20  $\mu$ l de 1 mM espermina sobre la mica previamente exfoliada durante 1 minuto aproximadamente y posteriormente se lavó con abundante agua Milli-Q y se secó con nitrógeno gas.

Las reacciones se prepararon con 1.65 ng de DNA lineal (pGEM-3Z, Promega) de 2743 bp con 100  $\mu$ M del péptido KF en el tampón de reacción formado por 20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 100 mM NaCl. Las muestras se prepararon en un volumen final de 20  $\mu$ l y fueron incubadas a temperatura ambiente durante distintos tiempos (0, 10, 20 y 30 minutos). Posteriormente el volumen final se depositó durante 30 segundos en la mica previamente funcionalizada con espermina, se lavó con 3 ml de agua MilliQ y se secó con nitrógeno gas.

El pGEM-3Z se linearizó con la enzima de restricción BamHI-HF (*New England Biolabs*) a 37° durante 15 min en el tampón NEB4 proporcionado por el fabricante.

Las moléculas de ssDNA se prepararon mediante desnaturalización por calor a partir de las moléculas lineales de pGEM-3Z que fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente después colocadas en hielo para evitar la renaturalización de las moléculas. Estas moléculas permanecen estables



en su forma de cadena sencilla durante al menos 3 días a 4°C. Las reacciones de KF con ssDNA se prepararon en las mismas proporciones que para el dsDNA descritas anteriormente.

Las imágenes se tomaron con el AFM de Nanotec (Nanotec Electrónica, Madrid, Spain) descrito en la Sección 8 del Capítulo 1. El modo de medida utilizado es el modo dinámico con modulación en amplitud (*tapping*) con una amplitud pico-pico de 5 nm para evitar dañar la muestra. La frecuencia de barrido utilizada fue de 1-2 líneas/s. Las imágenes se tomaron en aire y a temperatura ambiente, en condiciones de humedad ambiente (30%). Las puntas utilizadas fueron el modelo PPP-NCH (PointProbePlus) de Nanosensors (Suiza). Ver **Tabla 1.1** para más detalle. La escala de color en todas las imágenes va de 0-2 nm de oscuro a brillante.

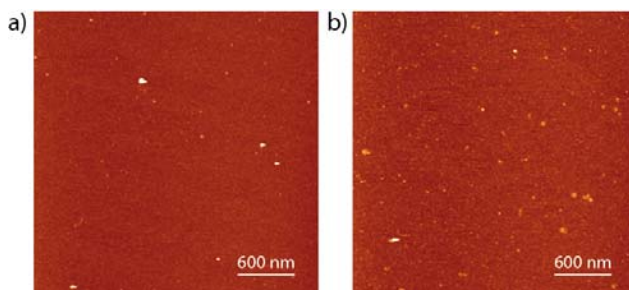
### 2.3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue visualizar el proceso de compactación del DNA en presencia del péptido KF, aportando información complementaria a los experimentos obtenidos por pinzas ópticas.

### 2.4. Resultados experimentales

#### 2.4.1. KF sin DNA

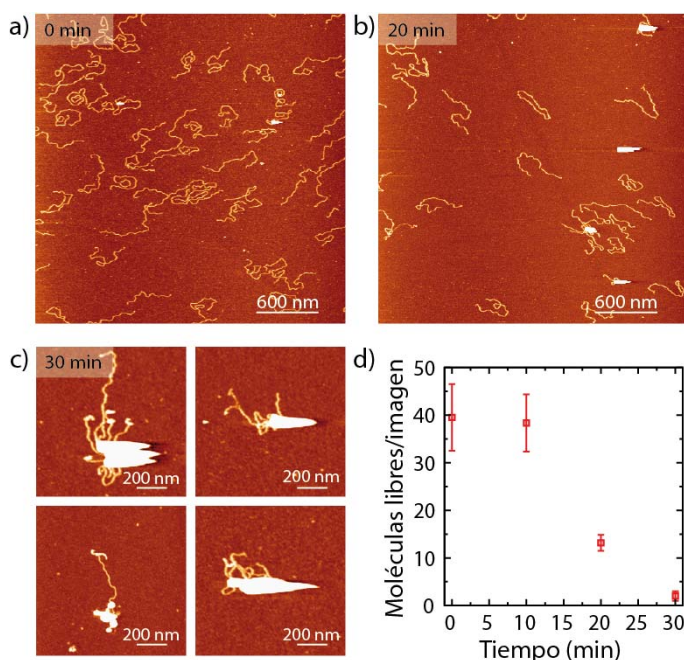
Dado que el péptido KF tenía tendencia a agregar, primero se comprobó si esto ocurría en el tiempo de incubación de la muestra. Para ello, se prepararon dos muestras sin DNA: una se depositó en la mica sin incubación, y la otra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. En ambos casos no se observaron agregados grandes del péptido, sino ocasionalmente algún agregado pequeño como los que se observan en la **Figura 5.17**.



**Figura 5.17. Imágenes de AFM del péptido KF en ausencia de DNA. a)** Experimento con 100  $\mu$ M de KF sin incubación. **b)** Experimento con 100  $\mu$ M de KF a los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

### 2.4.2. Interacción de KF con DNA de cadena doble

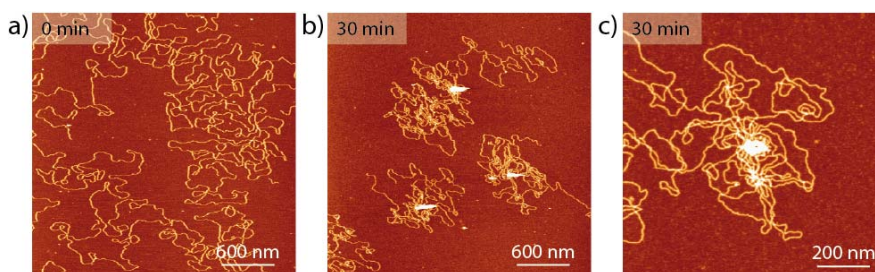
Cuando el péptido KF (100  $\mu\text{M}$ ) se incuba en presencia de dsDNA (0.9 nM) se forman agregados cuyo tamaño aumenta con el tiempo de incubación (ver **Figura 5.18**). Asimismo, a medida que los agregados que se forman son de mayor tamaño, la cantidad de moléculas de DNA libres adsorbidas en la mica disminuye. Mientras que en el experimento a tiempo cero y con 10 minutos de incubación el número de moléculas libres de DNA es equivalente al número de moléculas libres observadas sin KF (aprox. 38 moléculas en  $9\text{ }\mu\text{m}^2$ ), a partir de los 20 minutos de incubación se observa una reducción brusca del número de moléculas de DNA libres hasta llegar a los 30 minutos donde no se observan moléculas de DNA en la mica. El agregado presenta moléculas de DNA que salen del mismo lo que sugiere que el péptido KF actúa como intermediario en interacciones DNA-DNA (**Figura 5.18 (c)**).



**Figura 5.18. Interacción de KF con DNA de cadena doble.** Imágenes de AFM del plásmido pGEM-3Z linearizado (2743 bp) incubado a temperatura ambiente con KF (100  $\mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos: **a)** 0 min, **b)** 20 min y **c)** 30 min. **d)** Densidad de moléculas libres observadas en las imágenes de AFM ( $9\text{ }\mu\text{m}^2$ ) a distintos tiempos de incubación con KF (100  $\mu\text{M}$ ). La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 2.2 nm

Puesto que nuestros colaboradores emplearon un fragmento del genoma del bacteriófago lambda (24 kbp) para hacer sus experimentos con pinzas ópticas y observar la compactación de DNA, nosotros decidimos repetir los experimentos de AFM con la molécula completa de  $\lambda$ -DNA (48 kbp).

Los experimentos realizados con  $\lambda$ -DNA dieron los mismos resultados. Sin KF, la molécula de DNA se adsorbió en la superficie de la mica homogéneamente (**Figura 5.19 (a)**). Sin embargo, cuando se añadió KF (100  $\mu$ M) durante 30 minutos, el resultado fue que las moléculas de  $\lambda$ -DNA se empezaron a compactar entre sí, formando puntos de nucleación como el que se muestra en la **Figura 5.19 (b y c)**.



**Figura 5.19. Interacción de KF con  $\lambda$ -DNA (48 kbp).** a) Imagen de  $\lambda$ -DNA sin KF. b) y c) Imágenes de AFM de  $\lambda$ -DNA (50 ng) incubado con KF (100  $\mu$ M) durante 30 minutos. La escala de color (de oscuro a claro) va de 0 – 2.2 nm.

Además, experimentos complementarios realizados con la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés de *Dynamic Light Scattering*) indicaron que los agregados de KF aumentaban su radio hidrodinámico con el tiempo (Camunas-Soler, 2013). Estos resultados son consistentes con lo observado mediante microscopía de fuerzas atómicas.

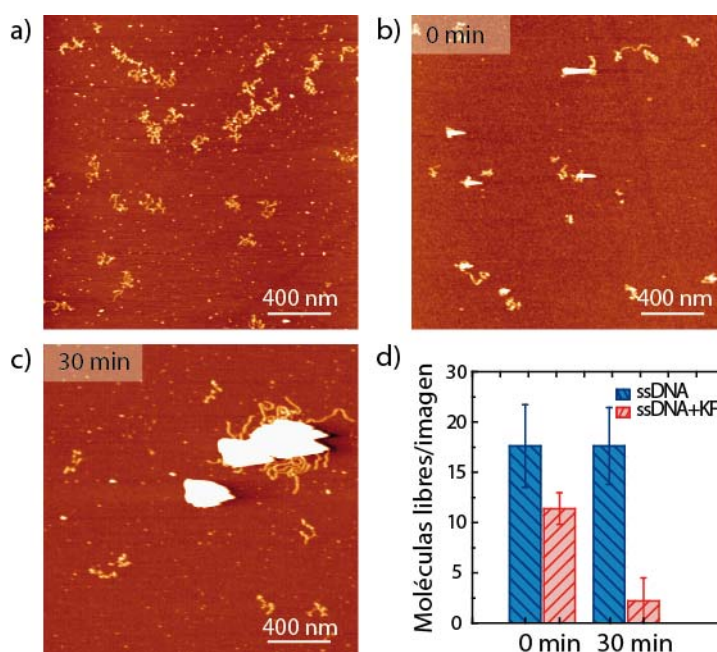
#### 2.4.3. Interacción de KF con DNA de cadena sencilla

En los experimentos de pinzas ópticas realizados por nuestros colaboradores, se observó que el péptido KF interaccionaba con moléculas de DNA de cadena sencilla. Por lo tanto, decidimos realizar experimentos con AFM con moléculas de ssDNA.

Cuando el péptido KF interacciona con moléculas de ssDNA se forman agregados inmediatamente después de mezclarlos. Como se puede ver en la **Figura 5.20**, el número de moléculas de ssDNA libres en la mica se redujo de 17 (sin KF) a 12 moléculas libres por imagen de 4  $\mu$ m<sup>2</sup> inmediatamente después de mezclar el DNA con el KF. Esto quiere decir que las moléculas de ssDNA son más accesibles para el péptido, permitiendo así la formación de pequeños agregados desde el principio.

Por otra parte, un tiempo de incubación mayor, de 30 minutos, provocó una reducción mayor del número de moléculas libres de DNA, aproximadamente a 2 moléculas libres por imagen de 4  $\mu$ m<sup>2</sup>. Esta reducción de moléculas libres va acompañada de la formación de agregados de mayor tamaño tal y como ocurre con las moléculas de DNA de cadena doble.

Sin embargo, en este caso las moléculas de DNA que se observan saliendo del agregado de KF eran moléculas de cadena doble, en lugar de moléculas de cadena sencilla. Un experimento control en el que las moléculas de ssDNA se dejaron incubar durante 30 minutos sin KF en las mismas condiciones, demostró que ese tiempo era insuficiente para que las moléculas de ssDNA se hibridaran formando dsDNA. Por lo tanto, se puede inferir de los experimentos con KF, que el péptido además de retener las moléculas de ssDNA favorece la hibridación de las mismas.



**Figura 5.20. Interacción de KF con ssDNA.** **a)** Imagen de moléculas de DNA de cadena sencilla (1.8 nM) adsorbidas sobre mica pretratada con espermina. **b)** Imagen de ssDNA (misma concentración) inmediatamente después de mezclarlo con KF (100 μM). **c)** Imagen de ssDNA (misma concentración) incubado con KF (100 μM) durante 30 minutos. **d)** Histograma de la densidad de moléculas de ssDNA libres observadas en las imágenes de AFM (4 μm<sup>2</sup>) a distintos tiempos de incubación (0 y 30 minutos) con KF (100 μM).

## 2.5. Discusión de los resultados

Los tratamientos citotóxicos actuales para combatir el cáncer se denominan de “campo quemado”. Se basan en que las células cancerosas crecen más rápido que las sanas y por lo tanto al introducir un componente tóxico en el organismo será incorporado más rápido en las células cancerígenas, produciendo la muerte celular. Si bien, la especificidad de los tratamientos anticancerígenos no es muy elevada para las células cancerosas, produciendo a cambio la muerte de células sanas.

El estudio de nuevos componentes anticancerígenos es un área de gran interés por sus aplicaciones farmacéuticas, diagnóstico médica, síntesis de nuevos componentes, etc. (Neto, 2009). El péptido KF es un fármaco anticancerígeno que tiene actividad citotóxica contra ciertas líneas celulares (Sewell, 2005), por lo que su estudio es importante para proporcionar nuevos datos sobre el mecanismo de interacción del péptido con el DNA.

Nuestros resultados de AFM indican que el péptido KF tiene una alta afinidad por sustratos negativos como el DNA. Mientras que con las moléculas de DNA de cadena doble su interacción se observa a lo largo del tiempo (20-30 min), la interacción con moléculas de DNA de cadena sencilla se observa inmediatamente después de mezclarlos.

Se ha observado que el tamaño de los agregados aumenta con el tiempo de incubación, lo que está de acuerdo con lo observado con los experimentos de pinzas ópticas y dispersión dinámica de luz. Además, la agregación de ssDNA favorece la hibridación del DNA, dado que en un experimento control realizado en las mismas condiciones sin KF las moléculas no se hibridan.

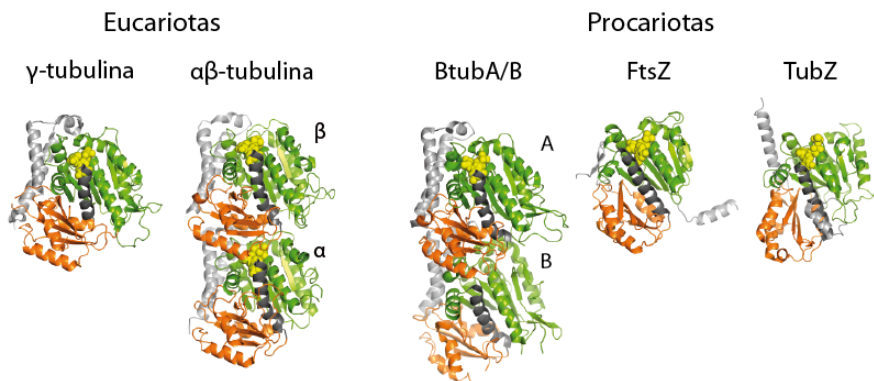


### 3. Filamentos de TubZ

#### 3.1. Introducción

La proteína TubZ pertenece a la familia de GTPasas con estructura homóloga a la tubulina y a FtsZ (Larsen, 2007). Las **tubulinas** están presentes en todos los sistemas eucariotas, polimerizan en forma de microtúbulos y están encargadas tanto del transporte de vesículas como de la segregación de cromosomas (Nogales, 1998). La proteína **FtsZ** es el análogo procariota a la tubulina y está implicada en la división celular en bacterias. La proteína FtsZ forma un anillo en la mitad de la célula durante la división celular (anillo Z), que ejerce la fuerza necesaria para contraerse hasta dividir la membrana celular formando dos células (Margolin, 2005). La proteína **TubZ** está implicada en la distribución del DNA de fagos y plásmidos dentro de la bacteria (Oliva, 2012).

Todas ellas son proteínas GTPasas que autoensamblan formando filamentos dinámicos y que comparten una gran homología estructural (**Figura 5.21**). En el extremo N-terminal (en verde manzana) tienen un dominio Rossman (en amarillo). Este dominio estructural es común en proteínas de unión a nucleótidos y está formado por tres láminas beta intercaladas por dos alfa hélices (beta-alfa-beta-alfa-beta-alfa). Además, separado por una larga hélice central (en verde oscuro), se encuentra el extremo C-terminal que contiene la actividad GTPasa (en naranja) y la cola terminal (en gris).



**Figura 5.21.** Estructura cristalina de las principales proteínas análogas de la familia de las tubulinas y FtsZ, en eucariotas y procariotas. Las estructuras son cortesía de Dra. Marian Oliva.

La microscopía de fuerzas atómicas se ha empleado para caracterizar gran parte de estas proteínas. Por ejemplo, se ha observado la dinámica de desen-



samblaje de los filamentos de FtsZ (Mateos-Gil, 2012) y otros grupos han caracterizado las propiedades mecánicas de microtúbulos (de Pablo, 2003) o el movimiento de la kinesina por ellos (Schaap, 2011). El proyecto que aquí se describe se realizó en colaboración con la Dra. Marian Oliva (CIB-CSIC, Madrid).

### 3.2. Materiales y métodos

La proteína TubZ nativa ha sido purificada por la Dra. Marian Oliva. Además de la proteína nativa, se ha purificado la proteína TubZ con las mutaciones puntuales E200A o T100A que son proteínas capaces de formar filamentos pero que no desensamblan a lo largo del tiempo. También se ha purificado la proteína TubY, que es una proteína moduladora que interacciona con los filamentos de TubZ. El protocolo para formar filamentos de TubZ consiste en lo siguiente: primero se diluye la proteína TubZ a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  en el tampón compuesto por 50 mM Pipes-KOH pH 6.5, 1 mM EDTA y 100 mM KOAc, y después se añade 1 mM GTP y 6 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Posteriormente se incuba a 30°C durante al menos 40 minutos. Para estudiar la interacción con la proteína moduladora TubY, se añade una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  TubY una vez terminado el tiempo de incubación de TubZ y se vuelve a incubar a 30°C durante al menos 40 minutos.

Para depositar los filamentos en la mica se trató la mica previamente exfoliada con 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  (100 mM). Después de unos segundos se lavó con varios ml de agua y se secó con nitrógeno gas. Sobre la mica pretratada se añadió los 20  $\mu\text{l}$  de la muestra una vez transcurrido el tiempo de incubación, se dejó 1 minuto y se lavó muy suavemente con 3 ml de agua Milli-Q con GTP (1 mM) y  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  (6 mM) para ayudar a la estabilidad de los filamentos. Los iones en solución incorporados al agua con GTP y Mg favorecían que la película de agua se eliminara con el uso de un papel de filtro en la parte inferior de la mica sin necesidad de secar con nitrógeno gas. Este procedimiento se implementó para no arrastrar los filamentos durante el secado.

Las imágenes fueron tomadas siguiendo el mismo procedimiento de las fibras amiloides de RepA (ver materiales y métodos página 90).

En los experimentos en medio líquido, se empleó como medio líquido el mismo tampón de ensamblaje de las fibras (50 mM Pipes-KOH pH 6.5, 1 mM EDTA y 100 mM KOAc complementado con 1 mM GTP y 6 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ) y dos modos de medida distintos: *tapping* y *jumping*. Las puntas utilizadas para cada modo de medida fueron las OMCL-TR400PSA y las OMCL-RC800PSA, respectivamente. Ver **Tabla 1.1** para más detalle. En el modo de modulación en amplitud, la amplitud empleada fue de  $\sim 2.5 - 3$  nm. En el modo de salto los parámetros utilizados fueron: *jump off*  $\sim 62$ , *jump sample*  $\sim 88$  y *control cycle*  $\sim 5$ .



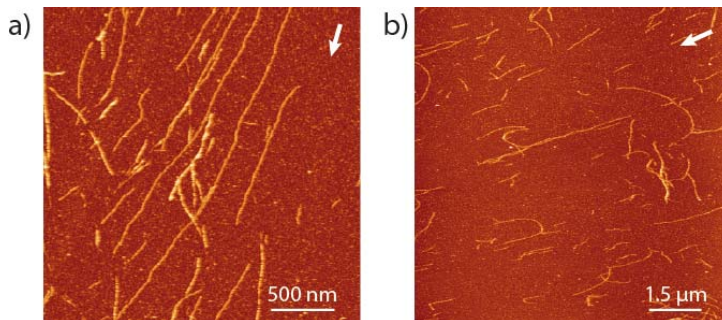
El tratamiento de las imágenes se hizo de la manera habitual con una subtracción de un plano y un *flatten* utilizando el software WSxM (Horcas, 2007).

### 3.3. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue la caracterización estructural de los filamentos de TubZ mediante AFM y la comprobación del autoensamblaje con la proteína moduladora TubY en las fibras de TubZ.

### 3.4. Resultados experimentales

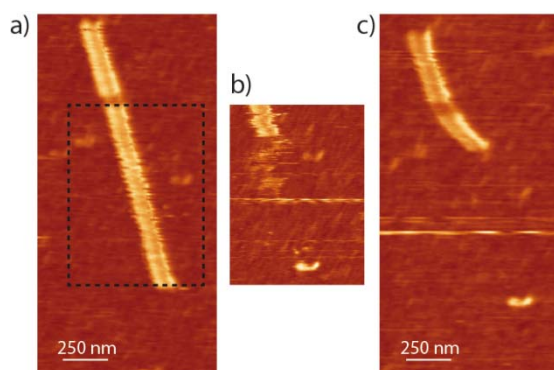
Los primeros experimentos que hicimos se realizaron en aire, con condiciones de lavado y secado habituales (ver Capítulo 4, Sección 2.2). Entre todos los métodos de adsorción probados (deposición de las fibras directamente sobre la mica, funcionalización de la mica con polilisina,  $\text{NiCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , o empleando grafito) el método que mejor resultado dio fue la funcionalización de la mica con  $\text{MgCl}_2$ . Sin embargo, desde el primer momento tuvimos problemas para poder adsorber las fibras en la superficie de la mica. Las condiciones de preparación de la muestra empleando el procedimiento habitual para el secado y el lavado, provocaban que los filamentos se alinearan en la dirección del secado y el lavado (Figura 5.22). Creemos que esto se debía a la alta concentración de proteína libre que hay en disolución, que es la primera en adsorberse a la mica y por lo tanto impide que las fibras se adsorban fuertemente a la superficie.



**Figura 5.22.** Imágenes de AFM de TubZ en aire, preparadas con el procedimiento habitual de lavado y secado. a) T100A y b) E200A. La flecha blanca en la parte superior derecha indica la dirección del lavado y secado.

A continuación decidimos observar las fibras en medio líquido utilizando el propio tampón de ensamblaje de las fibras. A pesar de ser un tampón adecuado para medir, resultó muy difícil obtener imágenes de las fibras debido a que las condiciones de adsorción no producían una fijación fuerte de los filamentos a la superficie. En alguna ocasión pudimos ver fibras en los prime-

ros minutos de comenzar el experimento, pero debido a que la adsorción de las fibras a la superficie era muy débil, sucesivos barridos provocaron que las fibras se despegasen de la superficie. Resultados equivalentes se observaron tanto con el modo de medida de *tapping* (imágenes no mostradas) como con el modo de *jumping* (**Figura 5.23**). Nunca se observaron fibras a partir de los 20 minutos posteriores a comenzar el experimento.



**Figura 5.23. Imágenes de AFM de TubZ en líquido tomadas en modo jumping.** **a)** Primera imagen tomada de TubZ. **b)** Zoom de TubZ correspondiente al recuadro en la imagen de a). La fibra se despega al comienzo de la imagen. **c)** Misma imagen pero después de hacer el zoom. La punta era doble en el momento de tomar las imágenes.

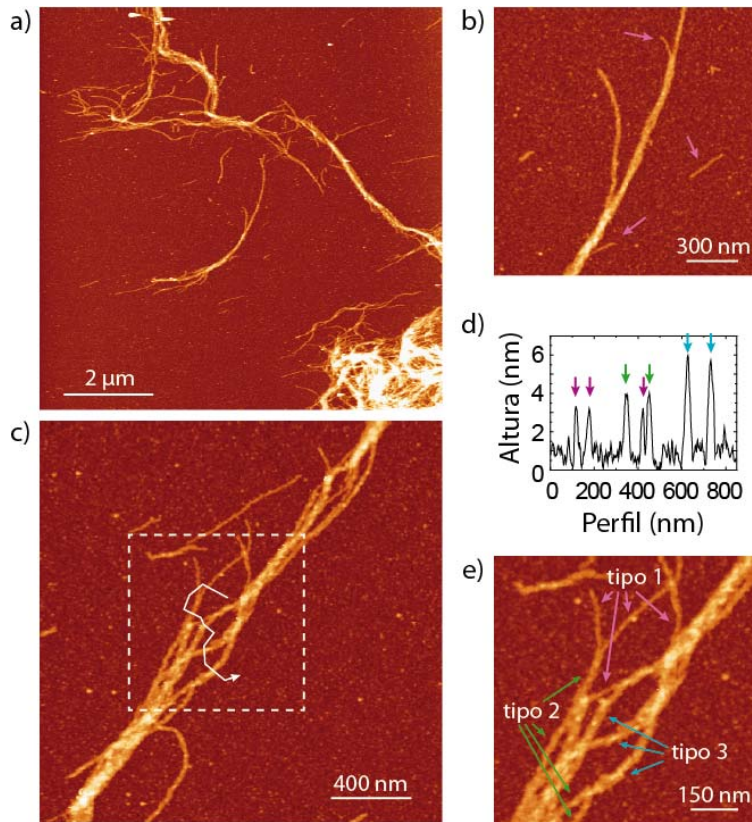
Por lo tanto, decidimos continuar con los experimentos en aire, mejorando el modo de preparación de la muestra. El lavado con agua Milli-Q con 1 mM GTP y 6 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  favorecía un secado al aire sin necesidad de usar nitrógeno gas, y de esta manera los filamentos quedaban adheridos a la superficie.

### 3.4.1. Filamentos de TubZ

Los experimentos se realizaron con las proteínas TubZ<sub>T100A</sub> y TubZ<sub>E200A</sub>, ya que con la proteína nativa apenas se observan filamentos. Con ambas proteínas se obtuvieron una amplia variedad de fibras: desde fibras de pocos nm, pasando por pequeñas agrupaciones de fibras, hasta grandes agrupaciones de fibras formando ovillos (como el que se muestra en la parte inferior derecha de la **Figura 5.24 (a)**). La estructura mínima que encontramos la denominamos de tipo 1 y tiene una altura media de  $2.7 \pm 0.3$  nm y una anchura media de  $14.6 \pm 1.8$  nm. Estas fibras de tipo 1 se agrupan entre sí formando fibras de mayor tamaño, como las fibras de tipo 2, aparentemente filamentos dobles de fibras de tipo 1, con una altura media de  $3.1 \pm 0.4$  nm y una anchura media de  $24.4 \pm 3.9$  nm. Y también se agrupan en estructuras de mayor tamaño como las fibras de tipo 3 o mayores (**Figura 5.24**) que no hemos ca-

racterizado la dificultad de extraer parámetros comunes en estas estructuras.

Estos datos estructurales han sido analizados para la proteína TubZ<sub>T100A</sub>, pero los resultados son equivalentes para la TubZ<sub>E200A</sub>. No tenemos datos de la proteína nativa debido a que no se ha podido adsorber a la mica.



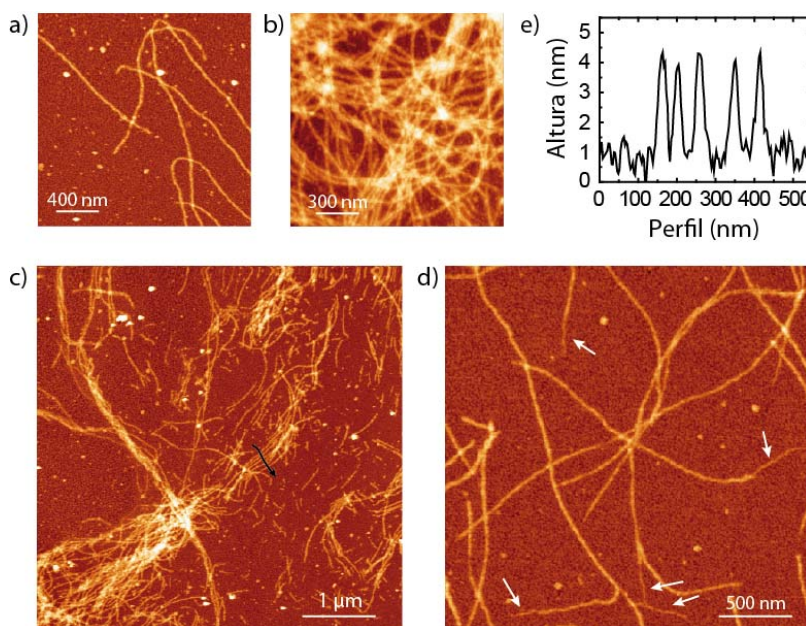
**Figura 5.24. Fibras de TubZ<sub>T100A</sub> observadas en aire lavando con GTP y Mg(OAc)<sub>2</sub> y secado al aire. a)** Imagen de gran área donde se observa un ovillo de fibras en la parte inferior derecha y otras fibras individuales y o encordadas. **b)** Imagen donde se observa el comienzo de un encordado de fibras. **c)** y **e)** Imágenes de los distintos tipos de fibras (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) **d)** Perfil de alturas de los distintos tipos de fibras indicados con colores (tipo 1, rosa; tipo 2, verde; y tipo 3, azul). La línea blanca en c) indica la posición del perfil.

Comparando nuestros datos con los obtenidos por microscopía electrónica, llegamos a la conclusión de que un filamento de tipo 1, está formado por un filamento doble de TubZ con estructura helicoidal. Y siguiendo la misma comparación, un filamento de tipo 2 está formado por un filamento de TubZ con estructura tetrahelicoidal.

### 3.4.2. Filamentos de TubZ y TubY

Una de las preguntas que queremos responder es cómo interacciona la proteína moduladora TubY con los filamentos de TubZ. Esta proteína también presente en este sistema de segregación de los plásmidos podría estar implicada en la estabilización de los filamentos de TubZ reduciendo la actividad GTPasa.

Los filamentos de la proteína TubZ nativa cuando se incuban con la proteína moduladora TubY sí que se adsorben a la mica, como se puede ver en la **Figura 5.25 (a y c)**. Esta vez, los filamentos no forman estructuras de mayor tamaño como grandes agrupaciones u ovillos sino que tienden a estar separadas a pesar de haber zonas con alta densidad de filamentos (**Figura 5.25 (b)**). Esto indica que las interacciones laterales se han reducido notablemente al introducir la proteína TubY.



**Figura 5.25. Filamentos de TubZ + TubY observados en aire lavando con agua con GTP y  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  y sin secado. a)** Imágenes de los filamentos más pequeños observadas por AFM. **b)** Imágenes de una zona con alta densidad de filamentos donde se observa poca interacción lateral de los mismos. **c)** Imagen de gran área donde se muestra los distintos tipos de estructuras que adoptan los filamentos. **d)** Detalle del extremo final de algunos filamentos señalados con una flecha, que correspondería con el comienzo del recubrimiento con TubY. **e)** Perfil de alturas indicado con una línea negra en c).

Por otra parte, se observa que el recubrimiento de los filamentos por TubY es homogéneo durante todo el filamento. En los experimentos realizados con la proteína TubZ<sub>E200A</sub>, se observa que en los extremos de algunos filamentos

aparece una estructura más fina (indicada con flechas blancas en la **Figura 5.25 (d)**). La altura media de estas estructuras es de  $2.0 \pm 0.1$  nm y una anchura media de  $14.8 \pm 1.2$  nm, lo que correspondería con los filamentos de tipo 1 encontrados en el experimento de TubZ. Esta estructura fina se recubre casi inmediatamente formando filamentos más gruesos y mucho más frecuentes. Estos filamentos tienen una altura media de  $2.8 \pm 0.4$  nm y una anchura media de  $25.4 \pm 2.7$  nm, lo que correspondería a filamentos dobles de TubZ + TubY (un perfil de alturas tomado a lo largo de la flecha negra, se muestra en la **Figura 5.25 (e)**).

Por lo tanto, a partir de nuestros experimentos concluimos que la proteína TubY interacciona con el filamento de TubZ. Esta aseveración se basa en las siguientes observaciones: primero, los filamentos de la proteína nativa no pudieron ser adsorbidos a la mica y segundo, las interacciones laterales de los filamentos se han reducido notablemente. A pesar de haber zonas con gran densidad de filamentos, éstos no forman grandes estructuras como racimos u ovillos. Además, dicha interacción se produce homogéneamente durante el filamento, con una proporción de 1:1 de proteína TubY:TubZ. Finalmente, los resultados de microscopía electrónica obtenidos por la Dra. Marian Oliva apoyan estos resultados.

### 3.5. Discusión de los resultados

Este proyecto en colaboración con la Dra. Marian Oliva ha sido todo un reto ya que no había experiencia previa en el grupo sobre proteínas que ensamblaban formando filamentos. El desarrollo de un método de preparación de la muestra que no requiriera un secado con nitrógeno fue clave para observar fibras en la superficie de la mica. En un futuro se pretende seguir trabajando en funcionalizar la mica con otros productos (APTES,  $\text{spd}^{+3}$ , etc.) para conseguir un fijado más fuerte y poder realizar experimentos en medio líquido. Esto abriría la posibilidad de estudiar la dinámica de ensamblaje o desensamblaje de los filamentos en tiempo real, como han hecho otros investigadores con filamentos de FtsZ (Mateos-Gil, 2012).

A pesar de todo, los experimentos realizados han permitido distinguir entre los distintos tipos de filamentos formados por TubZ, desde filamentos pequeños hasta grandes agrupaciones de filamentos. La mínima unidad observada corresponde con filamentos denominados de tipo 1 y correspondería con filamentos formados por dobles filamentos helicoidales. Además, se han caracterizado los filamentos de TubZ + TubY, obteniendo filamentos cuya estructura mínima corresponde con los filamentos de tipo 2 de TubZ. Estos datos indican que la proteína TubY se ha incorporado a los filamentos previamente formados de TubZ.

Esta colaboración todavía continúa en curso, con el objetivo final de proporcionar un modelo más completo del ensamblaje de la proteína TubZ formando filamentos. Por ejemplo, algunas de las preguntas por resolver serían: como ensamblan los filamentos en presencia del nucleótido no hidrolizable

GDP, o qué ocurre con proteínas truncadas por el dominio C-terminal encargado del ensamblaje de la fibra.



## 6. Conclusiones

En esta tesis hemos aplicado la microscopía de fuerzas atómicas a una gran variedad de sistemas biológicos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y estructuras autoensambladas. En cada caso hemos aplicado el modo de medida más conveniente para obtener los mejores resultados.

A continuación expondremos las principales conclusiones obtenidas durante esta tesis para cada proyecto:

### **Propiedades mecánicas del RNA**

1. Se han medido las propiedades mecánicas a corta escala (pocos nanómetros) de moléculas RNA de cadena doble a partir de imágenes de AFM de alta resolución. Se ha mostrado que dichas moléculas se comportan como estructuras más rígidas que lo predicho por modelos estadísticos como el WLC a distancias de pocos nanómetros. Estas medidas fueron comparadas con las propiedades mecánicas de moléculas de DNA de cadena doble con la misma secuencia, obteniendo resultados similares a los previamente publicados por Wiggings et al, donde mostraron por primera vez que las moléculas de DNA presentaban alta flexibilidad a corta escala. El método de adsorción basado en níquel, permitió equilibrar y coadsorber ambas moléculas en la misma superficie, permitiendo así una comparación directa de la altura y la anchura de las moléculas.

### **Desarrollo y aplicación de un método para medir volúmenes**

2. Se ha desarrollado un método para medir volúmenes a partir de imágenes de AFM basado en métodos directos desarrollados previamente en la li-

temperatura, a los que se ha introducido dos nuevas ideas: en primer lugar, el empleo de DNA como molécula de referencia y en segundo lugar, la introducción del concepto de densidad de volumen de ruido. Ambas ideas permitieron reducir el error relativo del volumen a la mitad y la comparación de medidas realizadas en distintos días y con puntas distintas. El método se aplicó a las proteínas del complejo SMC de *Bacillus subtilis*, obteniendo información tanto del estado oligomérico de las proteínas: ScpA es un monómero mientras que SMC y ScpB son dímeros en solución, como de las interacciones entre las proteínas del complejo SMC: ScpA interacciona con SMC mientras que ScpB sólo interacciona con SMC en presencia de ScpA. Este método también se aplicó a moléculas de ssDNA obteniendo una relación lineal entre el volumen de AFM de las moléculas y su longitud (en nucleótidos).

### Caracterización de proteínas iniciadoras de la replicación por AFM

3. Se han caracterizado dos proteínas *Rep*, proteínas iniciadoras de la replicación (TrfA y RepE), mediante AFM. Los resultados obtenidos fueron: 1) las proteínas *Rep* interaccionan en la región de los iterones; 2) las proteínas *Rep* interaccionan simultáneamente con los iterones y con un oligo que contiene la secuencia de una hebra de la región rica en ATs del origen de replicación; y 3) dicha interacción es específica de la secuencia. Estos resultados condujeron a formular un modelo en el cuál la proteína *Rep* no sólo se une a la región de los iterones, sino que además interacciona específicamente con una de las dos hebras de la región rica en ATs una vez formada la burbuja de replicación, estabilizando el sustrato para el posterior procesamiento de la helicasa y la polimerasa.

4. Se han caracterizado fibras de RepA-WH1 (A31V) mediante AFM. Las fibras mostraron una helicidad a izquierdas. También se ha observado que las fibras estaban formadas por un número variable de protofibras que interaccionan entre sí lateralmente formando la fibra.

### Estructuras de DNA origami

5. Se han caracterizado estructuras de DNA origami con el AFM observando que tienen las dimensiones y la estructura diseñada por nuestros colaboradores. Las estructuras origami estudiadas fueron más frágiles de lo esperado, produciendo daños en la muestra con fuerzas de  $\sim 200$  pN.

### Interacción del péptido KF con el DNA

6. Se ha observado la interacción del péptido KF con el DNA mediante AFM. El péptido KF interacciona con DNA de cadena doble formando agregados que aumentan de tamaño con el tiempo de incubación, mientras que la interacción con DNA de cadena sencilla se observa inmediatamente después de mezclarlos. Además, la agregación de ssDNA favorece la hibridación del DNA.



**Filamentos de TubZ:**

7. Se han caracterizado los filamentos formados por la proteína TubZ. Las imágenes de AFM permitieron distinguir desde filamentos dobles helicoidales, hasta grandes agrupaciones de filamentos. Además, se ha observado interacción de la proteína TubY en los filamentos de TubZ siendo ésta homogénea a lo largo del filamento.



## Publicaciones

1. **Fuentes-Perez, M. E.**, E. J. Gwynn, M. S. Dillingham y F. Moreno-Herrero (2012). "Using DNA as a fiducial marker to study SMC complex interactions with the atomic force microscope." *Biophysical Journal* 102 (4): 839-848.
2. Herrero-Galan, E., **M. E. Fuentes-Perez**, C. Carrasco, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, F. Moreno-Herrero y J. R. Arias-Gonzalez (2013). "Mechanical identities of RNA and DNA double helices unveiled at the single-molecule level." *Journal of the American Chemical Society*. 135 (1): 122-131.
3. Bell, N. A., V. V. Thacker, S. Hernandez-Ainsa, **M. E. Fuentes-Perez**, F. Moreno-Herrero, T. Liedl y U. F. Keyser (2013). "Multiplexed ionic current sensing with glass nanopores." *Lab on a Chip*. 13 (10): 1859-1862.
4. **Fuentes-Perez, M. E.**, M. S. Dillingham y F. Moreno-Herrero (2013). "AFM volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids." *Methods*. 60 (2): 113-121.
5. Camunas-Soler, J., S. Frutos, C. V. Bizarro, S. de Lorenzo, **M. E. Fuentes-Perez**, R. Ramsch, S. Vilchez, C. Solans, F. Moreno-Herrero, F. Albericio, R. Eritja, E. Giral, S. B. Dev y F. Ritort (2013). "Electrostatic binding and hydrophobic collapse of peptide-nucleic acid aggregates quantified using force spectroscopy." *ACS Nano*. 7 (6): 5102-5113.

6. Hernandez-Ainsa, S., N. A. Bell, V. V. Thacker, K. Gopfrich, K. Misiunas, **M. E. Fuentes-Perez**, F. Moreno-Herrero y U. F. Keyser (2013). "DNA origami nanopores for controlling DNA translocation." *ACS Nano*. 7 (7): 6024-6030.
7. Wegrzyn, K., **M.E. Fuentes-Perez**, K. Bury, M. Rajewska, F. Moreno-Herrero, y I. Konieczny. "Sequence specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin". *Nucleic Acid Research*. 42 (12): 7807-7818.
8. Torreira, E., M. Moreno, **M.E. Fuentes-Perez**, J. Martín-Benito, F. Moreno-Herrero, R. Giraldo and O. Llorca. "RepA Amyloid fibers of the bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulate the dimer to monomer transitions at initiation of DNA replication". *Structure*. (En revisión).
9. Oliva, M.A., **M. E. Fuentes-Perez** y F. Moreno-Herrero. "Structural insight into TubZ helical filaments assembly and dynamics". (En preparación).
10. **Fuentes-Perez, M. E.**, E. Herrero-Galan y F. Moreno-Herrero. "Double stranded RNA is hard to bend at short length scales". (En preparación).
11. Cañón Bermúdez, G.S., V. Natarajan, A. Ohmann, T. Schlichthärle, A. Szuba, M. Vahdatzadeh, P. Vasudevan, K.E. Viacava Romo, A. Ghaemi, M.S. Grieb, A. Czogalla, D. Kauert, **M.E. Fuentes-Perez**, F. Moreno-Herrero, P. Schwille, S. Diez, M. Schlierf, R. Seidel. "Programmable tethering system based on DNA origami structures linked to artificial vesicles". (En preparación).

## Bibliografía

**(Abels, 2005)** Abels, J., F. Moreno-Herrero, T. Van der Heijden, C. Dekker y N. Dekker (2005). "Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA." *Biophysical journal*. **88** (4): 2737-2744.

**(Alberts, 2010)** Alberts, B. (2010). *Biología Molecular de la Célula* 5ª Ed., Ediciones Omega, S.A.

**(Albrecht, 1991)** Albrecht, T., P. Grütter, D. Horne y D. Rugar (1991). "Frequency modulation detection using high - Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity." *Journal of Applied Physics*. **69** (2): 668-673.

**(Alegre-Cebollada, 2014)** Alegre-Cebollada, J., P. Kosuri, D. Giganti, E. Eckels, J. A. Rivas-Pardo, N. Hamdani, C. M. Warren, R. J. Solaro, W. A. Linke y J. M. Fernández (2014). "S-Glutathionylation of Cryptic Cysteines Enhances Titin Elasticity by Blocking Protein Folding." *Cell*. **156** (6): 1235-1246.

**(Allison, 2010)** Allison, D. P., N. P. Mortensen, C. J. Sullivan y M. J. Doktycz (2010). "Atomic force microscopy of biological samples." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. **2** (6): 618-634.

**(Ando, 2001)** Ando, T., N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito y A. Toda (2001). "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98** (22): 12468-12472.

**(Ando, 2007)** Ando, T., T. Uchihashi, N. Kodera, D. Yamamoto, M. Taniguchi, A. Miyagi y H. Yamashita (2007). "High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes." *J Mol Recognit.* **20** (6): 448-458.

**(Ando, 2008)** Ando, T., T. Uchihashi y T. Fukuma (2008). "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes." *Progress in Surface Science.* **83** (7): 337-437.

**(Ando, 2012a)** Ando, T. (2012a). "High-speed atomic force microscopy coming of age." *Nanotechnology.* **23** (6): 062001.

**(Ando, 2012b)** Ando, T., T. Uchihashi y N. Kodera (2012b). "High-speed atomic force microscopy." *Japanese Journal of Applied Physics.* **51** (8).

**(Aragon, 2013)** Aragon, L., E. Martinez-Perez y M. Merckenschlager (2013). "Condensin, cohesin and the control of chromatin states." *Current opinion in genetics & development.* **23** (2): 204-211.

**(Arranz, 2012)** Arranz, R., G. Mercado, J. Martín-Benito, R. Giraldo, O. Monasterio, R. Lagos y J. M. Valpuesta (2012). "Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: identification of the precursors." *Journal of structural biology.* **178** (1): 54-60.

**(Balunas, 2005)** Balunas, M. J. y A. D. Kinghorn (2005). "Drug discovery from medicinal plants." *Life sciences.* **78** (5): 431-441.

**(Baró, 2012)** Baró, A. M. y R. G. Reifengerger (2012). Atomic force microscopy in liquid: biological applications. John Wiley & Sons.

**(Bastos, 2004)** Bastos, M., V. Castro, G. Mrevlishvili y J. Teixeira (2004). "Hydration of ds-DNA and ss-DNA by neutron quasielastic scattering." *Biophys J.* **86** (6): 3822-3827.

**(Baumann, 1997)** Baumann, C. G., S. B. Smith, V. A. Bloomfield y C. Bustamante (1997). "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules." *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **94** (12): 6185-6190.

**(Beerens, 2005)** Beerens, N., J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, W. Vermeulen y C. Wyman (2005). "The CSB protein actively wraps DNA." *J Biol Chem.* **280** (6): 4722-4729.

**(Berge, 2000)** Berge, T., D. J. Ellis, D. T. Dryden, J. M. Edwardson y R. M. Henderson (2000). "Translocation-independent dimerization of the EcoKI endonuclease visualized by atomic force microscopy." *Biophys J.* **79** (1): 479-484.

**(Billingsley, 2010)** Billingsley, D. J., J. Kirkham, W. A. Bonass y N. H. Thomson (2010). "Atomic force microscopy of DNA at high humidity: irreversible conformational switching of supercoiled molecules." *Physical Chemistry Chemical Physics*. **12** (44): 14727-14734.

**(Binnig, 1982)** Binnig, G. y H. Rohrer (1982). "Scanning tunneling microscopy." *Helvetica Phys. Acta*. **55**: 726-735.

**(Binnig, 1986)** Binnig, G., C. F. Quate y C. Gerber (1986). "Atomic force microscope." *Phys Rev Lett*. **56** (9): 930-933.

**(Blasina, 1996)** Blasina, A., B. L. Kittell, A. E. Toukdarian y D. R. Helinski (1996). "Copy-up mutants of the plasmid RK2 replication initiation protein are defective in coupling RK2 replication origins." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93** (8): 3559-3564.

**(Bosco, 2014)** Bosco, A., J. Camunas-Soler y F. Ritort (2014). "Elastic properties and secondary structure formation of single-stranded DNA at monovalent and divalent salt conditions." *Nucleic Acids Res*. **42** (3): 2064-2074.

**(Bowater, 2005)** Bowater, R. P. (2005). *DNA Structure*. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

**(Brinkers, 2009)** Brinkers, S., H. R. Dietrich, F. H. de Groote, I. T. Young y B. Rieger (2009). "The persistence length of double stranded DNA determined using dark field tethered particle motion." *The Journal of chemical physics*. **130**: 215105.

**(Brown, 2005)** Brown, T. A., C. Cecconi, A. N. Tkachuk, C. Bustamante y D. A. Clayton (2005). "Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism." *Genes Dev*. **19** (20): 2466-2476.

**(Bürmann, 2013)** Bürmann, F., H.-C. Shin, J. Basquin, Y.-M. Soh, V. Giménez-Oya, Y.-G. Kim, B.-H. Oh y S. Gruber (2013). "An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin." *Nature structural & molecular biology*. **20** (3): 371-379.

**(Bustamante, 2000)** Bustamante, C., S. B. Smith, J. Liphardt y D. Smith (2000). "Single-molecule studies of DNA mechanics." *Curr Opin Struct Biol*. **10** (3): 279-285.

**(Bustamante, 2003)** Bustamante, C., Z. Bryant y S. B. Smith (2003). "Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics." *Nature*. **421** (6921): 423-427.

**(Camunas-Soler, 2013)** Camunas-Soler, J., S. Frutos, C. V. Bizarro, S. de Lorenzo, M. E. Fuentes-Perez, R. Ramsch, S. Vilchez, C. Solans, F. Moreno-Herrero, F. Albericio, R. Eritja, E. Giralt, S. B. Dev y F. Ritort (2013). "Electrostatic Binding and Hydrophobic Collapse of Peptide–Nucleic Acid Aggregates Quantified Using Force Spectroscopy." *ACS Nano*. **7** (6): 5102-5113.

**(Cantor, 1980)** Cantor, C. R. y P. R. Schimmel (1980). *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*.

**(Carpick, 1997)** Carpick, R. W. y M. Salmeron (1997). "Scratching the Surface: Fundamental Investigations of Tribology with Atomic Force Microscopy." *Chem Rev*. **97** (4): 1163-1194.

**(Carpick, 1999)** Carpick, R. W., D. F. Ogletree y M. Salmeron (1999). "A General Equation for Fitting Contact Area and Friction vs Load Measurements." *J Colloid Interface Sci*. **211** (2): 395-400.

**(Carrasco, 2008)** Carrasco, C., M. Castellanos, P. J. De Pablo y M. G. Mateu (2008). "Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105** (11): 4150-4155.

**(Cuervo, 2012)** Cuervo, A. y J. L. Carrascosa (2012). "Bacteriophages: structure." *eLS*.

**(Daudén, 2013)** Daudén, M. I. (2013). *Caracterización de la terminasa mayor del bacteriófago T7*, Universidad Autónoma de Madrid.

**(de Pablo, 1998)** de Pablo, P., J. Colchero, J. Gomez-Herrero y A. Baro (1998). "Jumping mode scanning force microscopy." *Applied physics letters*. **73** (22): 3300-3302.

**(De Pablo, 2000)** De Pablo, P., F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. G. Herrero, P. Herrero, A. Baró, P. Ordejón, J. M. Soler y E. Artacho (2000). "Absence of dc-Conductivity in  $\lambda$ -DNA." *Physical review letters*. **85** (23): 4992.

**(de Pablo, 2003)** de Pablo, P. J., I. A. Schaap, F. C. MacKintosh y C. F. Schmidt (2003). "Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale." *Physical Review Letters*. **91** (9): 098101.

**(Derjaguin, 1975)** Derjaguin, B., V. Muller y Y. P. Toporov (1975). "Effect of contact deformations on the adhesion of particles." *Journal of Colloid and interface science*. **53** (2): 314-326.



**(Díaz-López, 2006)** Díaz-López, T., C. Davila-Fajardo, F. Blaesing, M. P. Lillo y R. Giraldo (2006). "Early events in the binding of the pPS10 replication protein RepA to single iteron and operator DNA sequences." *J Mol Biol.* **364** (5): 909-920.

**(Drake, 1989)** Drake, B., C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma y P. K. Hansma (1989). "Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope." *Science.* **243** (4898): 1586-1589.

**(Duderstadt, 2011)** Duderstadt, K. E., K. Chuang y J. M. Berger (2011). "DNA stretching by bacterial initiators promotes replication origin opening." *Nature.* **478** (7368): 209-213.

**(Eaton, 2010)** Eaton, P. y P. West (2010). Atomic force microscopy. Oxford University Press Cary, NC, USA.

**(Edstrom, 1990)** Edstrom, R. D., M. H. Meinke, X. R. Yang, R. Yang, V. Elings y D. F. Evans (1990). "Direct visualization of phosphorylase-phosphorylase kinase complexes by scanning tunneling and atomic force microscopy." *Biophys J.* **58** (6): 1437-1448.

**(El Kirat, 2005)** El Kirat, K., I. Burton, V. Dupres y Y. F. Dufrene (2005). "Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy." *J Microsc.* **218** (Pt 3): 199-207.

**(Ellis, 1999)** Ellis, D. J., D. T. Dryden, T. Berge, J. M. Edwardson y R. M. Henderson (1999). "Direct observation of DNA translocation and cleavage by the EcoKI endonuclease using atomic force microscopy." *Nat Struct Biol.* **6** (1): 15-17.

**(Encinar, 2013)** Encinar, M., A. V. Kralicek, A. Martos, M. Krupka, S. Cid, A. Alonso, A. Rico, I. M. Jiménez y M. Vélez (2013). "Polymorphism of FtsZ filaments on lipid surfaces: role of monomer orientation." *Langmuir.* **29** (30): 9436-9446.

**(Feng, 2000)** Feng, J. Q. (2000). "Contact behavior of spherical elastic particles: a computational study of particle adhesion and deformations." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* **172** (1-3): 175-198.

**(Fuentes-Perez, 2012)** Fuentes-Perez, M. E., E. J. Gwynn, M. S. Dillingham y F. Moreno-Herrero (2012). "Using DNA as a fiducial marker to study SMC complex interactions with the atomic force microscope." *Biophys J.* **102** (4): 839-848.

**(Fuentes-Perez, 2013)** Fuentes-Perez, M. E., M. S. Dillingham y F. Moreno-Herrero (2013). "AFM volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids." *Methods*. **60** (2): 113-121.

**(Garcia-Manyes, 2007)** Garcia-Manyes, S., J. Brujić, C. L. Badilla y J. M. Fernández (2007). "Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of I27 and ubiquitin." *Biophysical journal*. **93** (7): 2436-2446.

**(Garcia, 1992)** Garcia, N. y V. T. Binh (1992). "van der Waals forces in atomic force microscopy operating in liquids: A spherical-tip model." *Physical Review B*. **46** (12): 7946.

**(García, 1999)** García, R. y A. San Paulo (1999). "Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy." *Physical Review B*. **60** (7): 4961-4967.

**(García, 2002)** García, R. y R. Perez (2002). "Dynamic atomic force microscopy methods." *Surface science reports*. **47** (6): 197-301.

**(Ghosal, 2013)** Ghosal, S., N. Laohakunakorn, B. Gollnick, F. Moreno-Herrero, D. G. Aarts, R. Dullens y U. F. Keyser (2013). "A Landau-Squire Nanojet." *Bulletin of the American Physical Society*. **58**.

**(Giessibl, 1995)** Giessibl, F. J. (1995). "Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy." *Science*. **267** (5194): 68-71.

**(Gil, 2002)** Gil, A., P. De Pablo, J. Colchero, J. Gómez-Herrero y A. Baró (2002). "Electrostatic scanning force microscopy images of long molecules: single-walled carbon nanotubes and DNA." *Nanotechnology*. **13** (3): 309.

**(Giraldo, 2003a)** Giraldo, R. (2003a). "Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives." *FEMS Microbiol Rev*. **26** (5): 533-554.

**(Giraldo, 2003b)** Giraldo, R., C. Fernández-Tornero, P. R. Evans, R. Díaz-Orejas y A. Romero (2003b). "A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain." *Nature Structural & Molecular Biology*. **10** (7): 565-571.

**(Giraldo, 2004)** Giraldo, R. y M. E. Fernandez-Tresguerres (2004). "Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the

activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids." *Plasmid*. **52** (2): 69-83.

**(Goodman, 1991)** Goodman, F. O. y N. Garcia (1991). "Roles of the attractive and repulsive forces in atomic-force microscopy." *Physical Review B*. **43** (6): 4728.

**(Goodsell, 2011)** Goodsell, D. S. (2011). Molecule of the Month: DNA. *pdb*, *pdb*. doi: [10.2210/rcsb\\_pdb/mom\\_2001\\_11](https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2001_11).

**(Gross, 2011)** Gross, P., N. Laurens, L. B. Oddershede, U. Bockelmann, E. J. Peterman y G. J. Wuite (2011). "Quantifying how DNA stretches, melts and changes twist under tension." *Nature Physics*. **7** (9): 731-736.

**(Gruber, 2014)** Gruber, S., J.-W. Veening, J. Bach, M. Blettinger, M. Bramkamp y J. Errington (2014). "Interlinked Sister Chromosomes Arise in the Absence of Condensin during Fast Replication in *B. subtilis*." *Current Biology*. **24** (3): 293-298.

**(Haering, 2002)** Haering, C. H., J. Lowe, A. Hochwagen y K. Nasmyth (2002). "Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex." *Mol Cell*. **9** (4): 773-788.

**(Hagerman, 1988)** Hagerman, P. J. (1988). "Flexibility of DNA." *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*. **17** (1): 265-286.

**(Hamann, 1993)** Hamann, M. T. y P. J. Scheuer (1993). "Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp." *Journal of the American Chemical Society*. **115** (13): 5825-5826.

**(Hamon, 2007)** Hamon, L., D. Pastre, P. Dupaigne, C. Le Breton, E. Le Cam y O. Pietrement (2007). "High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein--DNA complexes." *Nucleic Acids Res*. **35** (8): e58.

**(Hansma, 1995)** Hansma, H. G., D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer y P. K. Hansma (1995). "Applications for atomic force microscopy of DNA." *Biophys J*. **68** (5): 1672-1677.

**(Hansma, 1996)** Hansma, H. G. y D. E. Laney (1996). "DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy." *Biophys J*. **70** (4): 1933-1939.

**(Hansma, 1997)** Hansma, H. G., K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allen y S. M. Parsons (1997). "Properties of Biomolecules

Measured from Atomic Force Microscope Images: A Review." *Journal of Structural Biology*. **119** (2): 99-108.

**(Hansma, 2001)** Hansma, H. G. (2001). "Surface biology of DNA by atomic force microscopy." *Annu Rev Phys Chem*. **52**: 71-92.

**(Hansma, 1994)** Hansma, P., J. Cleveland, M. Radmacher, D. Walters, P. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. Hansma y C. Prater (1994). "Tapping mode atomic force microscopy in liquids." *Applied Physics Letters*. **64** (13): 1738-1740.

**(Hansma, 2006)** Hansma, P. K., G. Schitter, G. E. Fantner y C. Prater (2006). "High-speed atomic force microscopy." *Science*. **314** (5799): 601.

**(Heller, 2014)** Heller, I., T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. Peterman y G. J. Wuite (2014). "Optical Tweezers Analysis of DNA-Protein Complexes." *Chemical reviews*.

**(Henderson, 1996)** Henderson, R. M., S. Schneider, Q. Li, D. Hornby, S. J. White y H. Oberleithner (1996). "Imaging ROMK1 inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel protein using atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93** (16): 8756-8760.

**(Hernández-Ainsa, 2013)** Hernández-Ainsa, S., N. A. Bell, V. V. Thacker, K. Göpfrich, K. Misiunas, M. E. Fuentes-Perez, F. Moreno-Herrero y U. F. Keyser (2013). "DNA origami nanopores for controlling DNA translocation." *ACS nano*. **7** (7): 6024-6030.

**(Herrero-Galán, 2012)** Herrero-Galán, E., M. E. Fuentes-Perez, C. Carrasco, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa, F. Moreno-Herrero y J. R. Arias-Gonzalez (2012). "Mechanical identities of RNA and DNA double helices unveiled at the single-molecule level." *Journal of the American Chemical Society*. **135** (1): 122-131.

**(Hirano, 2002)** Hirano, M. y T. Hirano (2002). "Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA." *EMBO J*. **21** (21): 5733-5744.

**(Hirano, 2004)** Hirano, M. y T. Hirano (2004). "Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins." *EMBO J*. **23** (13): 2664-2673.

**(Hirano, 2006)** Hirano, T. (2006). "At the heart of the chromosome: SMC proteins in action." *Nature reviews Molecular cell biology*. **7** (5): 311-322.

**(Horcas, 2007)** Horcas, I., R. Fernandez, J. M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero y A. M. Baro (2007). "WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology." *Rev Sci Instrum.* **78** (1): 013705.

**(Hormeno, 2011)** Hormeno, S., F. Moreno-Herrero, B. Ibarra, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta y J. R. Arias-Gonzalez (2011). "Condensation prevails over BA transition in the structure of DNA at low humidity." *Biophysical journal.* **100** (8): 2006-2015.

**(Huang, 2009)** Huang, B., M. Bates y X. Zhuang (2009). "Super resolution fluorescence microscopy." *Annual review of biochemistry.* **78**: 993.

**(Ido, 2013)** Ido, S., K. Kimura, N. Oyabu, K. Kobayashi, M. Tsukada, K. Matsushige y H. Yamada (2013). "Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution." *ACS nano.*

**(Ivanova, 2009)** Ivanova, M. I., S. A. Sievers, M. R. Sawaya, J. S. Wall y D. Eisenberg (2009). "Molecular basis for insulin fibril assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **106** (45): 18990-18995.

**(Jaafar, 2012)** Jaafar, M., D. Martínez-Martín, M. Cuenca, J. Melcher, A. Raman y J. Gómez-Herrero (2012). "Drive-amplitude-modulation atomic force microscopy: From vacuum to liquids." *Beilstein journal of nanotechnology.* **3** (1): 336-344.

**(Johnson, 1971)** Johnson, K., K. Kendall y A. Roberts (1971). "Surface energy and the contact of elastic solids." *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences.* **324** (1558): 301-313.

**(Johnson, 1997)** Johnson, K. y J. Greenwood (1997). "An adhesion map for the contact of elastic spheres." *Journal of Colloid and Interface Science.* **192** (2): 326-333.

**(Johnson, 1987)** Johnson, K. L. y K. L. Johnson (1987). Contact mechanics. Cambridge university press.

**(Jones, 2002)** Jones, R., H. M. Pollock, J. A. S. Cleaver y C. S. Hodges (2002). "Adhesion Forces between Glass and Silicon Surfaces in Air Studied by AFM: Effects of Relative Humidity, Particle Size, Roughness, and Surface Treatment." *Langmuir.* **18** (21): 8045-8055.

**(Kodera, 2010)** Kodera, N., D. Yamamoto, R. Ishikawa y T. Ando (2010). "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy." *Nature.* **468** (7320): 72-76.

**(Kolatka, 2010)** Kolatka, K., S. Kubik, M. Rajewska y I. Konieczny (2010). "Replication and partitioning of the broad-host-range plasmid RK2." *Plasmid*. **64** (3): 119-134.

**(Kowalczyk, 2005)** Kowalczyk, L., M. Rajewska y I. Konieczny (2005). "Positioning and the specific sequence of each 13-mer motif are critical for activity of the plasmid RK2 replication origin." *Mol Microbiol*. **57** (5): 1439-1449.

**(Kuo, 2010)** Kuo, T.-L., S. Garcia-Manyes, J. Li, I. Barel, H. Lu, B. J. Berne, M. Urbakh, J. Klafter y J. M. Fernández (2010). "Probing static disorder in Arrhenius kinetics by single-molecule force spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107** (25): 11336-11340.

**(Kuzuya, 2014)** Kuzuya, A. y Y. Ohya (2014). "Nanomechanical Molecular Devices made of DNA Origami." *Accounts of chemical research*.

**(Larsen, 2007)** Larsen, R. A., C. Cusumano, A. Fujioka, G. Lim-Fong, P. Patterson y J. Pogliano (2007). "Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*." *Genes & development*. **21** (11): 1340-1352.

**(Le Grimmellec, 1998)** Le Grimmellec, C., E. Lesniewska, M.-C. Giocondi, E. Finot, V. Vié y J.-P. Goudonnet (1998). "Imaging of the surface of living cells by low-force contact-mode atomic force microscopy." *Biophysical journal*. **75** (2): 695-703.

**(Lee, 2003)** Lee, S. I., S. W. Howell, A. Raman y R. Reifengerger (2003). "Nonlinear dynamic perspectives on dynamic force microscopy." *Ultramicroscopy*. **97** (1-4): 185-198.

**(Li, 1999)** Li, J., D. Swanson, D. Qin, H. Brothers, L. Piehler, D. Tomalia y D. Meier (1999). "Characterizations of core-shell tecto-(dendrimer) molecules by tapping mode atomic force microscopy." *Langmuir*. **15** (21): 7347-7350.

**(López-Macià, 2001)** López-Macià, À., J. C. Jiménez, M. Royo, E. Giralt y F. Albericio (2001). "Synthesis and Structure Determination of Kahalalide F1, 2." *Journal of the American Chemical Society*. **123** (46): 11398-11401.

**(López-Polín, 2014)** López-Polín, G., C. Gómez-Navarro, V. Parente, F. Guinea, M. I. Katsnelson, F. Pérez-Murano y J. Gómez-Herrero (2014). "Stiffening graphene by controlled defect creation." *arXiv preprint arXiv:1406.2131*.

**(Lu, 2013)** Lu, J.-X., W. Qiang, W.-M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith y R. Tycko (2013). "Molecular Structure of  $\beta$ -Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue." *Cell*. **154** (6): 1257-1268.

**(Llauró, 2014)** Llauró, A., P. Guerra, N. Irigoyen, J. F. Rodríguez, N. Verdaguer y P. J. de Pablo (2014). "Mechanical Stability and Reversible Fracture of Vault Particles." *Biophysical journal*. **106** (3): 687-695.

**(Margolin, 2005)** Margolin, W. (2005). "FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **6** (11): 862-871.

**(Martin, 1987)** Martin, J., D. Williams y F. R. Weis, Jr. (1987). "Comparison of three anesthetic techniques on emetic symptoms using sufentanil for outpatient surgery." *AANA J*. **55** (3): 245-249.

**(Martínez, 2011)** Martínez, L., M. Tello, M. Díaz, E. Román, R. Garcia y Y. Huttel (2011). "Aspect-ratio and lateral-resolution enhancement in force microscopy by attaching nanoclusters generated by an ion cluster source at the end of a silicon tip." *Review of Scientific Instruments*. **82** (2): -.

**(Martinez, 2005)** Martinez, R. y L. Chacon-Garcia (2005). "The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work." *Current medicinal chemistry*. **12** (2): 127-151.

**(Mascarenhas, 2005)** Mascarenhas, J., A. V. Volkov, C. Rinn, J. Schiener, R. Guckenberger y P. L. Graumann (2005). "Dynamic assembly, localization and proteolysis of the Bacillus subtilis SMC complex." *BMC Cell Biol*. **6**: 28.

**(Mateos-Gil, 2012)** Mateos-Gil, P., A. Paez, I. Hörger, G. Rivas, M. Vicente, P. Tarazona y M. Vélez (2012). "Depolymerization dynamics of individual filaments of bacterial cytoskeletal protein FtsZ." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109** (21): 8133-8138.

**(Matsunaga, 1997)** Matsunaga, F., M. Ishiai, G. Kobayashi, H. Uga, T. Yura y C. Wada (1997). "The central region of RepE initiator protein of mini-F plasmid plays a crucial role in dimerization required for negative replication control." *J Mol Biol*. **274** (1): 27-38.

**(Mazur, 2014)** Mazur, A. K. y M. Maaloum (2014). "DNA flexibility on short length scales probed by atomic force microscopy." *Physical review letters*. **112** (6): 068104.

**(McMullan, 2009)** McMullan, G., S. Chen, R. Henderson y A. Faruqi (2009). "Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy." *Ultramicroscopy*. **109** (9): 1126-1143.

**(Meister, 2004)** Meister, G. y T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature*. **431** (7006): 343-349.

**(Melby, 1998)** Melby, T. E., C. N. Ciampaglio, G. Briscoe y H. P. Erickson (1998). "The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge." *J Cell Biol.* **142** (6): 1595-1604.

**(Mertens, 2012)** Mertens, J., M. I. Daudén, J. L. Carrascosa y J. Tamayo (2012). "Stepwise motion of a microcantilever driven by the hydrolysis of viral ATPases." *Nanotechnology*. **23** (1): 015501.

**(Min, 2005)** Min, W., B. P. English, G. Luo, B. J. Cherayil, S. Kou y X. S. Xie (2005). "Fluctuating enzymes: lessons from single-molecule studies." *Accounts of chemical research*. **38** (12): 923-931.

**(Minh, 2009)** Minh, P. N., N. Devroede, J. Massant, D. Maes y D. Charlier (2009). "Insights into the architecture and stoichiometry of Escherichia coli PepA\*DNA complexes involved in transcriptional control and site-specific DNA recombination by atomic force microscopy." *Nucleic Acids Res.* **37** (5): 1463-1476.

**(Miyake, 1995)** Miyake, S. (1995). "1 nm deep mechanical processing of muscovite mica by atomic force microscopy." *Applied physics letters*. **67** (20): 2925-2927.

**(Molina-Guijarro, 2011)** Molina-Guijarro, J. M., Á. Macías, C. García, E. Muñoz, L. F. García-Fernández, M. David, L. Núñez, J. F. Martínez-Leal, V. Moneo y C. Cuevas (2011). "Irvalec inserts into the plasma membrane causing rapid loss of integrity and necrotic cell death in tumor cells." *PLoS one*. **6** (4): e19042.

**(Moreno-Herrero, 2000)** Moreno-Herrero, F., P. De Pablo, J. Colchero, J. Gómez-Herrero y A. Baró (2000). "The role of shear forces in scanning force microscopy: a comparison between the jumping mode and tapping mode." *Surface science*. **453** (1): 152-158.

**(Moreno-Herrero, 2003)** Moreno-Herrero, F., J. Colchero y A. Baro (2003). "DNA height in scanning force microscopy." *Ultramicroscopy*. **96** (2): 167-174.

**(Moreno-Herrero, 2004)** Moreno-Herrero, F., J. Colchero, J. Gomez-Herrero y A. Baro (2004). "Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids." *Physical Review E*. **69** (3): 031915.



**(Moreno-Herrero, 2005)** Moreno-Herrero, F., M. de Jager, N. H. Dekker, R. Kanaar, C. Wyman y C. Dekker (2005). "Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA." *Nature*. **437** (7057): 440-443.

**(Müller, 1995)** Müller, D. J., F. A. Schabert, G. Büldt y A. Engel (1995). "Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy." *Biophys J*. **68** (5): 1681-1686.

**(Müller, 2011)** Müller, D. J. y Y. F. Dufrêne (2011). "Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface." *Trends in cell biology*. **21** (8): 461-469.

**(Neaves, 2009)** Neaves, K. J., L. P. Cooper, J. H. White, S. M. Carnally, D. T. Dryden, J. M. Edwardson y R. M. Henderson (2009). "Atomic force microscopy of the EcoKI Type I DNA restriction enzyme bound to DNA shows enzyme dimerization and DNA looping." *Nucleic Acids Res*. **37** (6): 2053-2063.

**(Neidle, 2010)** Neidle, S. (2010). Principles of nucleic acid structure. Academic Press.

**(Neish, 2002)** Neish, C. S., I. L. Martin, R. M. Henderson y J. M. Edwardson (2002). "Direct visualization of ligand-protein interactions using atomic force microscopy." *Br J Pharmacol*. **135** (8): 1943-1950.

**(Nelson, 2005)** Nelson, P. C., S. Bromberg y M. Radosavljevic (2005). Física biológica: energía, información, vida. Ed. Reverté.

**(Neto, 2009)** Neto, B. A. y A. A. Lapis (2009). "Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends." *Molecules*. **14** (5): 1725-1746.

**(Neumeister, 1994)** Neumeister, J. M. y W. A. Ducker (1994). "Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers." *Review of Scientific Instruments*. **65** (8): 2527-2531.

**(Newman, 2003)** Newman, D. J., G. M. Cragg y K. M. Snader (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." *Journal of natural products*. **66** (7): 1022-1037.

**(Nogales, 1998)** Nogales, E., K. H. Downing, L. A. Amos y J. Löwe (1998). "Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases." *Nature Structural & Molecular Biology*. **5** (6): 451-458.

**(Noy, 2012)** Noy, A. y R. Golestanian (2012). "Length scale dependence of DNA mechanical properties." *Physical review letters*. **109** (22): 228101.

**(Oliva, 2012)** Oliva, M. A., A. J. Martin-Galiano, Y. Sakaguchi y J. M. Andreu (2012). "Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109** (20): 7711-7716.

**(Pastre, 2003)** Pastre, D., O. Pietrement, S. Fusil, F. Landousy, J. Jeusset, M. O. David, L. Hamon, E. Le Cam y A. Zozime (2003). "Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study." *Biophys J*. **85** (4): 2507-2518.

**(Pietrasanta, 1999)** Pietrasanta, L. I., D. Thrower, W. Hsieh, S. Rao, O. Stemmann, J. Lechner, J. Carbon y H. Hansma (1999). "Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96** (7): 3757-3762.

**(Pinheiro, 2011)** Pinheiro, A. V., D. Han, W. M. Shih y H. Yan (2011). "Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology." *Nature nanotechnology*. **6** (12): 763-772.

**(Pyne, 2014)** Pyne, A., R. Thompson, C. Leung, D. Roy y B. W. Hoogenboom (2014). "Single-Molecule Reconstruction of Oligonucleotide Secondary Structure by Atomic Force Microscopy." *Small*.

**(Rajewska, 2012)** Rajewska, M., K. Wegrzyn y I. Konieczny (2012). "AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons." *FEMS Microbiol Rev*. **36** (2): 408-434.

**(Raman, 2008)** Raman, A., J. Melcher y R. Tung (2008). "Cantilever dynamics in atomic force microscopy." *Nano Today*. **3** (1-2): 20-27.

**(Ratcliff, 2001)** Ratcliff, G. C. y D. A. Erie (2001). "A novel single-molecule study to determine protein--protein association constants." *J Am Chem Soc*. **123** (24): 5632-5635.

**(Rivetti, 1996)** Rivetti, C., M. Guthold y C. Bustamante (1996). "Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis." *J Mol Biol*. **264** (5): 919-932.

**(Rivetti, 1999)** Rivetti, C., M. Guthold y C. Bustamante (1999). "Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex." *The EMBO journal*. **18** (16): 4464-4475.

**(Rojo, 1993)** Rojo, M. I. (1993). Ingeniería Genética. Ed. Pirámide.

**(Rosa-Zeiser, 1999)** Rosa-Zeiser, A., E. Weilandt, S. Hild y O. Marti (1999). "The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation." *Measurement Science and Technology*. **8** (11): 1333.

**(Rothemund, 2006)** Rothemund, P. W. (2006). "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns." *Nature*. **440** (7082): 297-302.

**(Saenger, 1984)** Saenger, W. (1984). DNA structure. Principles of Nucleic Acid Structure, Springer: 253-282.

**(Santos, 2011)** Santos, S., A. Verdaguer, T. Souier, N. H. Thomson y M. Chiesa (2011). "Measuring the true height of water films on surfaces." *Nanotechnology*. **22** (46): 465705.

**(Schaap, 2011)** Schaap, I. A., C. Carrasco, P. J. de Pablo y C. F. Schmidt (2011). "Kinesin walks the line: single motors observed by atomic force microscopy." *Biophysical journal*. **100** (10): 2450-2456.

**(Scheuring, 2003)** Scheuring, S., J. Seguin, S. Marco, D. Levy, B. Robert y J. L. Rigaud (2003). "Nanodissection and high-resolution imaging of the Rhodospseudomonas viridis photosynthetic core complex in native membranes by AFM. Atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100** (4): 1690-1693.

**(Schlacher, 2005)** Schlacher, K., K. Leslie, C. Wyman, R. Woodgate, M. M. Cox y M. F. Goodman (2005). "DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome." *Mol Cell*. **17** (4): 561-572.

**(Schneider, 1995)** Schneider, S., G. Folprecht, G. Krohne y H. Oberleithner (1995). "Immunolocalization of lamins and nuclear pore complex proteins by atomic force microscopy." *Pflugers Arch*. **430** (5): 795-801.

**(Schneider, 1998)** Schneider, S. W., J. Larmer, R. M. Henderson y H. Oberleithner (1998). "Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy." *Pflugers Arch*. **435** (3): 362-367.

**(Seidel, 2004)** Seidel, R., J. van Noort, C. van der Scheer, J. G. Bloom, N. H. Dekker, C. F. Dutta, A. Blundell, T. Robinson, K. Firman y C. Dekker (2004). "Real-time observation of DNA translocation by the type I restriction modification enzyme EcoR124I." *Nat Struct Mol Biol*. **11** (9): 838-843.

**(Sewell, 2005)** Sewell, J., I. Mayer, S. Langdon, J. Smyth, D. Jodrell y S. Guichard (2005). "The mechanism of action of Kahalalide F: variable cell permeability in human hepatoma cell lines." *European Journal of Cancer*. **41** (11): 1637-1644.

**(Shlyakhtenko, 2007)** Shlyakhtenko, L. S., J. Gilmore, A. Portillo, G. Tamulaitis, V. Siksnyis y Y. L. Lyubchenko (2007). "Direct visualization of the EcoRII-DNA triple synaptic complex by atomic force microscopy." *Biochemistry*. **46** (39): 11128-11136.

**(Shlyakhtenko, 2011)** Shlyakhtenko, L. S., A. Y. Lushnikov, M. Li, L. Lackey, R. S. Harris y Y. L. Lyubchenko (2011). "Atomic force microscopy studies provide direct evidence for dimerization of the HIV restriction factor APOBEC3G." *J Biol Chem*. **286** (5): 3387-3395.

**(Smela, 1999)** Smela, E. y N. Gadegaard (1999). "Surprising volume change in PPy (DBS): an atomic force microscopy study." *Advanced Materials*. **11** (11): 953-957.

**(Smith, 1992)** Smith, S. B., L. Finzi y C. Bustamante (1992). "Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads." *Science*. **258** (5085): 1122-1126.

**(Smith, 1996)** Smith, S. B., Y. Cui y C. Bustamante (1996). "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules." *Science*. **271** (5250): 795-799.

**(Sorel, 2006)** Sorel, I., O. Piétrement, L. Hamon, S. Baconnais, E. Le Cam y D. Pastré (2006). "The EcoRI-DNA complex as a model for investigating protein-DNA interactions by atomic force microscopy." *Biochemistry*. **45** (49): 14675-14682.

**(Sotres, 2007)** Sotres, J., A. Lostao, C. Gómez-Moreno y A. Baró (2007). "Jumping mode AFM imaging of biomolecules in the repulsive electrical double layer." *Ultramicroscopy*. **107** (12): 1207-1212.

**(Tang, 2007)** Tang, M., C. Cecconi, C. Bustamante y D. C. Rio (2007). "Analysis of P element transposase protein-DNA interactions during the early stages of transposition." *J Biol Chem*. **282** (39): 29002-29012.

**(Tatara, 1993)** Tatara, Y. (1993). "Large Deformations of a Rubber Sphere under Diametral Compression: Part 1: Theoretical Analysis of Press Approach, Contact Radius and Lateral Extension." *JSME international journal. Ser. A, Mechanics and material engineering*. **36** (2): 190-196.

**(Taylor, 1980)** Taylor, A. y G. R. Smith (1980). "Unwinding and rewinding of DNA by the RecBC enzyme." *Cell*. **22** (2 Pt 2): 447-457.

**(Thomson, 2007)** Thomson, N. (2007). Atomic Force Microscopy of DNA Structure and Interactions. Applied Scanning Probe Methods VI. B. Bhushan y S. Kawata, Springer Berlin Heidelberg: 127-164.

**(Toukdarian, 1996)** Toukdarian, A. E., D. R. Helinski y S. Perri (1996). "The plasmid RK2 initiation protein binds to the origin of replication as a monomer." *Journal of Biological Chemistry*. **271** (12): 7072-7078.

**(Vafabakhsh, 2012)** Vafabakhsh, R. y T. Ha (2012). "Extreme bendability of DNA less than 100 base pairs long revealed by single-molecule cyclization." *Science*. **337** (6098): 1097-1101.

**(van der Linden, 2009)** van der Linden, E., H. Sanchez, E. Kinoshita, R. Kanaar y C. Wyman (2009). "RAD50 and NBS1 form a stable complex functional in DNA binding and tethering." *Nucleic Acids Res.* **37** (5): 1580-1588.

**(Verhoeven, 2002)** Verhoeven, E. E., C. Wyman, G. F. Moolenaar y N. Goosen (2002). "The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands." *EMBO J.* **21** (15): 4196-4205.

**(Villarrubia, 1994)** Villarrubia, J. S. (1994). "Morphological estimation of tip geometry for scanned probe microscopy." *Surface Science*. **321** (3): 287-300.

**(Vivando, 2002)** Vivando, F. (2002). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica, Madrid: Ed. Síntesis.

**(Volkov, 2003)** Volkov, A., J. Mascarenhas, C. Andrei-Selmer, H. D. Ulrich y P. L. Graumann (2003). "A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure." *Mol Cell Biol.* **23** (16): 5638-5650.

**(Wagner, 1989)** Wagner, R. W., J. E. Smith, B. S. Cooperman y K. Nishikura (1989). "A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and *Xenopus* eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **86** (8): 2647-2651.

**(Wang, 1997)** Wang, M. D., H. Yin, R. Landick, J. Gelles y S. M. Block (1997). "Stretching DNA with optical tweezers." *Biophysical journal*. **72** (3): 1335-1346.

**(Wang, 2013)** Wang, X., P. M. Llopis y D. Z. Rudner (2013). "Organization and segregation of bacterial chromosomes." *Nature Reviews Genetics*. **14** (3): 191-203.

**(Watson, 1953)** Watson, J. D. y F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids." *Nature*. **171** (4356): 737-738.

**(Watson, 2004)** Watson, J. D. (2004). *Molecular Biology of the Gene*. Pearson/Benjamin Cummings.

**(Wegrzyn, 2014)** Wegrzyn, K., M. E. Fuentes-Perez, K. Bury, M. Rajewska, F. Moreno-Herrero y I. Konieczny (2014). "Sequence-specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin." *Nucleic acids research*. **42** (12): 7807-7818.

**(Wiggins, 2006)** Wiggins, P. A., T. Van Der Heijden, F. Moreno-Herrero, A. Spakowitz, R. Phillips, J. Widom, C. Dekker y P. C. Nelson (2006). "High flexibility of DNA on short length scales probed by atomic force microscopy." *Nature Nanotechnology*. **1** (2): 137-141.

**(Witte, 2008)** Witte, G., R. Fedorov y U. Curth (2008). "Biophysical analysis of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA binding protein." *Biophys J*. **94** (6): 2269-2279.

**(Woo, 2009)** Woo, J.-S., J.-H. Lim, H.-C. Shin, M.-K. Suh, B. Ku, K.-H. Lee, K. Joo, H. Robinson, J. Lee y S.-Y. Park (2009). "Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions." *Cell*. **136** (1): 85-96.

**(Wyman, 1997)** Wyman, C., I. Rombel, A. K. North, C. Bustamante y S. Kustu (1997). "Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein." *Science*. **275** (5306): 1658-1661.

**(Xu, 2010)** Xu, H., H. T. Beernink y S. W. Morrical (2010). "DNA-binding properties of T4 UvsY recombination mediator protein: polynucleotide wrapping promotes high-affinity binding to single-stranded DNA." *Nucleic acids research*. **38** (14): 4821-4833.

**(Yang, 1996)** Yang, G., J. P. Vesenska y C. J. Bustamante (1996). "Effects of tip - sample forces and humidity on the imaging of DNA with a scanning force microscope." *Scanning*. **18** (5): 344-350.

**(Yeeles, 2010)** Yeeles, J. T. y M. S. Dillingham (2010). "The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes." *DNA Repair (Amst)*. **9** (3): 276-285.

**(Yeeles, 2011)** Yeeles, J. T., K. van Aelst, M. S. Dillingham y F. Moreno-Herrero (2011). "Recombination hotspots and single-stranded DNA binding proteins couple DNA translocation to DNA unwinding by the AddAB helicase-nuclease." *Mol Cell*. **42** (6): 806-816.

**(Yuan, 2008)** Yuan, C., H. Chen, X. W. Lou y L. A. Archer (2008). "DNA bending stiffness on small length scales." *Physical review letters*. **100** (1): 018102.

**(Yuan, 2013)** Yuan, S., F. Luan, X. Song, L. Liu y J. Liu (2013). "Reconstruction of an AFM image based on estimation of the tip shape." *Measurement Science and Technology*. **24** (10): 105404.

**(Zwanzig, 1992)** Zwanzig, R. (1992). "Dynamical disorder: passage through a fluctuating bottleneck." *The Journal of chemical physics*. **97** (5): 3587-3589.





## Agradecimientos

Llega el momento de poner fin a una etapa y son muchas las personas que se me pasan por la cabeza en estos momentos. En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, Fernando Moreno, por confiar en mí para hacer esta tesis doctoral y por enseñarme la magia del AFM. Creo que has sabido sacar lo mejor de mí en cada momento y eso se nota en los resultados. Eres un ejemplo a seguir. ¡Muchas gracias por todo!

También quiero agradecer especialmente a mis dos compañeros que me han acompañado durante toda mi tesis, Benjamín y Carolina. Ambos estabais cuando llegué en 2009 y desde entonces vuestra compañía, amistad y apoyo ha sido inmejorable. Carol, ¡qué grandes conversaciones hemos tenido estos años! Gracias por transmitirme tu sabiduría dentro y fuera del laboratorio. Benjamín, eres el alemán más español que conozco. Tus comentarios nunca dejan de sorprenderme. ¡Te deseo lo mejor! Poco a poco fueron llegando nuevos miembros al grupo. Maite, nuestra informática para todo y sufridora del Labview, que fue un gran apoyo en el día a día, especialmente a la hora de comer ;). Los estudiantes de máster, Francesca, Aitor e Ignacio, cada uno aportasteis vuestro granito de arena. ¡Qué bueno que encontrarais cada uno vuestro camino! A Laura por su gran simpatía y gran trabajo en tan sólo dos meses. Y a los nuevos y no tan nuevos doctorandos del grupo, César y Julene, os deseo lo mejor en vuestras tesis y en lo que venga.

También a mis compañeros de despacho, José Jesús y Charo. ¡Qué buenos ratos pasamos! No se puede tener mejor humor haciendo figuras que el que ha demostrado José Jesús. Charo, siempre me has ayudado en todo. Eres un amor de persona y te deseo mucha suerte para lo que venga. A todos, gracias por cuidarme con todo tipo de dulces especialmente en esta última etapa de mi tesis.

A mis compañeros del sótano. ¡No me puedo imaginar un ambiente mejor en el que haber estado en el CNB! A los que todavía están, Ana y Rebeca, y a los que ya se han ido, Elías, María, Silvia, Adriana, José... Gracias por vuestra ayuda, compañía y tertulias dentro y fuera del CNB ¡Espero volver a coincidir con vosotros más adelante! También quiero agradecer a todos los que estáis en el sótano, cuando bajo de vez en cuando. Soy incapaz de nombraros a todos, pero me gustaría agradecer vuestra gran simpatía durante estos años.

Tampoco me puedo olvidar de mis chicas junior. La gran sintonía y entusiasmo que hemos tenido este tiempo se nota en cada actividad que organizamos. ¡Ojalá y que nunca se pierda el espíritu junior en el CNB! Gracias a José Mari, Alfonso y Carmen por vuestro apoyo en nuestras propuestas.

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin los excelentes colaboradores con los que hemos contado durante estos años. Nuestros fieles colaboradores de Bristol, el grupo de Mark Dillingham. *Mark, I've always learnt a lot from you. It was a pleasure being a few weeks in your lab in Bristol. Thanks a lot! Also to Emma and James for teach me a lot of things about proteins and gels. And many thanks to James and Neville for having good time out of the lab and teach me how to cook a chili con carne! I wish you all the best!* También a todos nuestros colaboradores algo más ocasionales. A Ricardo Arias y en especial a Elías Herrero por su inestimable ayuda y disponibilidad para resolver todas mis dudas. Al grupo de Igor Konieczny y en especial a Kasia por su gran simpatía. A Marian Oliva por transmitirme su pasión y dedicación hacia las TubZ y ser tan comprensiva conmigo ¡Ha sido un placer trabajar contigo! A Félix Ritort por su confianza en nosotros y su entusiasmo en la ciencia. A Rafael Giraldo, Oscar Llorca, María Moreno y Eva de Alba por vuestra amabilidad y dedicación. Al grupo de Ulrich Keyser y Ralf Seidel por darme la oportunidad de observar estructuras de DNA origami. A todos, por vuestra confianza.

También quiero agradecer a muchas otras personas del campus por brindarme su ayuda siempre que lo he necesitado. A Julio y Santiago, por vuestra cercanía y ayuda con cualquier tipo de problema con el AFM. A Pedro, Merche, Álvaro y Aída, por hacerme más ameno el paso por la universidad. A Elena T. H. por tu gran simpatía y tus comentarios tan valiosos.

Y por último y no puedo dejar de agradecer al gran equipo Nanotec. Sois un equipo excepcional con una gran calidad humana y profesional. Siempre habéis estado dispuestos a solucionar nuestros problemas y echarnos una mano en lo que necesitáramos. Os deseo lo mejor a cada uno de vosotros: Adriana, Pablo, Miriam, Nacho, Álex, Jaime, Luis, etc.

Fuera del CNB también hay personas que han sido importantes por unas cosas u otras. Empezando de lo más científico a lo menos, no se me puede olvidar Carmen García Payo. Fue por ti por quien empecé en la investigación durante la carrera. Siempre me has cuidado, me has enseñado y me has dado buenos consejos. ¡Muchas gracias por todo, Carmen!

A mis amigos de la carrera ¡qué buenos tiempos pasamos juntos! Siempre habéis estado ahí y afortunadamente puedo seguir contando con vosotros aunque algunos estéis más lejos que otros. Qué os puedo decir: Laura, gran compañera de batalla. Sin ti las bodas, cumpleaños... y no sigo por ahora, no hubieran sido lo mismo. Tus charlas por el gtalk son la caña y espero que sigan siempre así. Marta, siempre sincera y fiel a tus ideas. Admiro tu valentía al tomar decisiones, aunque eso implique sacrificar ciertas cosas. Te deseo lo mejor en tu nueva etapa de profe. Clara, para mí siempre has sido un ejemplo de excelencia. Tú me has demostrado que luchando se puede conseguir todo lo que te propones, aunque a veces sea con mucho esfuerzo y sacrificio. Gracias a las tres por esos desayunos tan reconfortantes. Bea, aunque pocas, qué largas y buenas conversaciones que tenemos. Ambas compartimos una visión parecida de la vida. Hace ya más de cuatro años que te fuiste a Tenerife y cómo han cambiado las cosas. ¡Entraste en el podio! Isma, cuánto echo de menos tus charlas filosóficas. Eres nuestro madrileño-vallecano por el mundo. Te deseo lo mejor en tu nueva etapa europea. Rubén, eres un luchador nato al que admiro. Ojalá y que nunca pierdas tu sentido del humor. Jesús, nuestro profe tan querido. Año tras año nos demuestras que hacer bien el trabajo tiene sus recompensas. Héctor, siempre dispuesto a echar una mano, con buena simpatía. No me puedo olvidar de mis queridas Laia y Andrea. A pesar de que nos vemos poco, siempre me hacéis sentir como si el tiempo no pasara. Ojalá y que en esta nueva etapa podamos vernos un poquito más.

A mis amigas de Soria, Pili, Rachel y Judy. Siempre estáis ahí y pase el tiempo que pase siempre compartiremos los buenos y malos momentos de la vida. Cada vez somos más en nuestras fotos de Navidad ;). Nunca dejáis de sorprenderme. ¡Sabéis que os quiero y os deseo lo mejor en todo!

A mis padres. Para mí sois un gran apoyo. Siempre habéis confiado en mí y me habéis animado a vuestra manera en todos mis proyectos. A pesar de que no sepáis muy bien de que va esta tesis, siempre me preguntáis con mucho interés. Esta tesis ha sido posible en gran parte gracias a vosotros. A mis hermanos, Alberto y Rubén, siempre habéis sido mi referente y un espejo en el que mirarme. Con el paso de los años, me he dado cuenta de qué diferentes podemos llegar a ser. Os deseo lo mejor al igual que a Ruth y Lucía. A mis sobrinos, Marcos, Sara, Sofía y Oliver, sois geniales. Siempre disfruto de vuestra compañía y me llenáis de energía. ¡Ojalá y que pudiera veros más a menudo!

A Álex, por hacerme feliz. Porque estos años no hubieran sido lo mismo sin tu compañía y sin tu apoyo. Y por tantas cosas más que no sé escribir. ¡Somos el mejor equipo!



*“Love doesn’t make the world go round.  
Love is what makes the ride worthwhile”.*

*Franklin P. Jones*